

Aus der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar

Direktor: Prof. Dr. med. N. Graf

***Messung der Aktivität der Thiopurin-S-Methyltransferase
in Erythrozyten***

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2006

vorgelegt von: Steffen Heinzmann

geb. am: 09. Dezember 1974 in Münster

Meinen Eltern
Hannelore und Ulrich

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung, Summary	6
1.1. Zusammenfassung	6
1.2. Summary	7
2. Einleitung	8
3. Arbeitsmaterialien und Geräte	12
3.1. HPLC-Anlage	12
3.2. Säulen	12
3.3. Arbeitsgeräte	12
3.4. Chemikalien	13
3.5. Blutproben für Standards	14
4. Probanden	15
4.1. Probanden zur Etablierung der Methode	15
4.1.1. Probanden zur Messung der Wiederfindungsrate	15
4.1.2. Probanden zur Vergleichsmessung bei unterschiedlicher Lagerungszeit des Vollblutes	15
4.1.3. Probanden zur Vergleichsmessung bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur (-30°C und -80°C)	16
4.2. Probanden im Lebensalter von 0 bis 18 Jahren zur Bestimmung der Referenzwerte	16
4.3. Probanden zur Testmessung der Aktivität in anderen Blutzellen	18
4.3.1. Bestimmung der Aktivität in Knochenmarkszellen	18
4.3.2. Bestimmung der Aktivität in Leukämiezellen	18
4.3.3. Vergleich der Aktivität in Leukämiezellen und Knochenmarks- zellen	18

5. Methodik	19
5.1. Probenentnahme und Herstellung der RBC – Lysate	19
5.2. Probenentnahme und Herstellung der Leukämiezellen- und Knochenmarks-Lysate	19
5.3. Aufbereitung der Proben	20
5.4. Messung	23
5.4.1. Schematisches Prinzip einer HPLC-Anlage	23
5.4.2. Messparameter und Optionen	24
5.4.3. Beschreibung eines Chromatogramms	26
5.4.4. Quantitative Analyse	27
5.4.5. Qualitative Analyse	28
5.5. Validierung der Meßmethode	29
5.6. Berechnung der Aktivität der Thiopurin-S-Methyltransferase	31
5.7. Angewandte statistische Methoden	31
6. Ergebnisse	32
6.1. Etablierung der Methode	32
6.1.1. Wiederfindungsrate	32
6.1.2. Vergleich der Aktivität bei verschiedener Lagerungszeit des Vollblutes	34
6.1.3. Vergleich der Aktivität bei Lagerung bei -30°C und -80°C	37
6.2. Referenzwerte im Lebensalter von 0 bis 18 Jahren	39
6.3. Aktivität in anderen Blutzellen	44
6.3.1. Aktivität in Knochenmarkszellen	44
6.3.2. Aktivität in Leukämiezellen	45
6.3.3. Vergleich der Aktivität in Leukämiezellen und Knochenmarkszellen	45
7. Diskussion	46
7.1. Etablierung der Methode	48
7.1.1. Wiederfindungsrate	48
7.1.2. Vergleich der Aktivität bei verschiedener Lagerungszeit des Vollblutes	48
7.1.3. Vergleich der Aktivität bei Lagerung bei -30°C und -80°C	49

7.2. Referenzwerte im Lebensalter von 0 bis 18 Jahren	50
7.3. Aktivität in anderen Blutzellen	54
7.3.1. Aktivität in Knochenmarkszellen	54
7.3.2. Aktivität in Leukämiezellen	54
7.3.3. Vergleich der Aktivität in Leukämiezellen und Knochenmarks- zellen	55
8. <i>Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen</i>	56
8.1. Verzeichnis der Tabellen	56
8.2. Verzeichnis der Abbildungen	58
9. <i>Literaturverzeichnis</i>	60
10. <i>Dank</i>	68
11. <i>Lebenslauf</i>	69
12. <i>Anhang: Abkürzungen</i>	71

1. Zusammenfassung, Summary

1.1. Zusammenfassung

Das häufigste Malignom im Kindesalter ist die akute lymphatische Leukämie mit einem Viertel aller Malignome bei Kindern. In der Behandlung werden unter anderem Antimetabolite wie 6-Mercaptopurin und Thioguanin eingesetzt. Diese wirken nach Biotransformation als Strukturanaloga der Nukleotide durch Abbruch der Nukleinsäuresynthese. Eine schwerwiegende Nebenwirkung der Thioguanine ist die Myelosuppression. Diese kann bei Überdosierung oder bei mangelnder Elimination auftreten. Das Schlüsselenzym der Inaktivierung und Elimination der Thioguanine ist die Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT). Bei einer niedrigen TPMT-Aktivität aufgrund eines genetischen Defektes kann es zur Akkumulation der Thioguanin-Nukleotide und damit zu einem erhöhten Risiko der Myelosuppression kommen. Analog können bei einer sehr hohen Aktivität durch übermäßige Elimination keine entsprechenden Wirkspiegel erreicht werden, so dass eine Remission nicht erreicht werden oder im Verlauf es zu einem Rezidiv kommen kann. Durch die Bestimmung der TPMT-Aktivität ist es möglich, vor Therapiebeginn eine individuelle Dosierung dieser Antimetabolite zu ermöglichen, mit dem Ziel eine nebenwirkungsärmere und effektivere Behandlung zu erreichen.

Hierfür wurde eine HPLC-Methode entwickelt, welche auf dem von der TPMT katalysierten Umbau von 6-Thioguanin in 6-Methylthioguanin basiert. Die Aktivität wurde in Erythrozyten gemessen. Zur Validierung der Methode wurden neben Untersuchungen zu Lagerungsmöglichkeiten des Untersuchungsmaterials ebenfalls Referenzwerte erstellt.

Hinsichtlich der Lagerungsmöglichkeiten zeigte sich eine über 14 Tage stabile TPMT-Aktivität bei Lagerung des Vollblutes bei +5°C. Nach Verarbeitung in RBC-Lysate blieb die TPMT-Aktivität gelagert bei -80°C und -30°C über 12 Monate unverändert.

Zur Ermittlung der Referenzwerte wurde von 346 gesunden Probanden (201 männlich, 145 weiblich) im Alter von 0-18 Jahren die TPMT-Aktivität bestimmt. Im Mittel konnte eine Aktivität von 46,20 nmol 6-MTG/gHb*h gemessen werden. Es zeigte sich eine signifikant höhere Aktivität bei Kindern im ersten Lebensjahr gegenüber dem Restkollektiv. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied der Aktivität ließ sich nicht feststellen.

Nebenbei wurde in Leukämiezellen und in Knochenmarkszellen ebenfalls eine TPMT-Aktivität nachgewiesen.

1.2. Summary

The acute lymphocytic leukemia is the most frequent malignant tumour in the childhood, representing one fourth of all malignomes in this age group. Among the treatment options antimetabolites such as 6-mercaptopurine and thioguanine can be applied. These substances act after biotransformation as structural analogs by interruption of the nucleic acid synthesis. A possible side-effect of thioguanines is myelosuppression. This can occur either due to overdose or lacking elimination. The key enzyme of this inactivation and elimination process is the thiopurine-S-methyltransferase (TPMT). A low TPMT-activity due to a genetic defect may result in accumulation of the thioguanine-nucleotides and increase the risk of myelosuppression. Equally, at a high activity due to accelerated elimination no efficient serum levels can be achieved. Hence, a remission cannot result or even a relapse might occur. The determination of the TPMT-activity can allow an individual dose application of these antimetabolites and achieve a more effective treatment.

For this reason, a HPLC-technique was developed based on the TPMT-catalytic reaction from 6-thioguanine to 6-methylthioguanine. The activity was measured in erythrocytes. For method validation, the extreme values were also assessed beside test series with regard to the storage conditions of the samples.

With respect to storage conditions a stable TPMT-activity was shown over 14 days at storage of the blood samples at +5°C. After preconditioning in RBC-lysate the TPMT-activity at storage at -80°C and -30°C remained at the same levels for 12 months.

For determination of the normal values the TPMT-activity was measured in 346 healthy test persons (201 male / 145 female) between 0 and 18 years old. A mean activity of 46.20 nmol 6-MTG/gHb*h could be determined. For children up to the age of one this activity was significantly higher compared to the rest. A gender-specific difference could not be observed. Furthermore, a TPMT-activity was also detected in leukaemia and bone marrow cells.

2. Einleitung

Malignome im Kindesalter (0-15 Jahre) sind selten mit einem Anteil von ca. 1% aller Malignome beim Menschen (Lightfoot et al., 2004). In Industrieländern wird die Rate mit nur 0,5% in der Literatur angeführt (Stiller, 2004) bei einer jährlichen Inzidenz von 70-160 Fällen pro einer Million Kinder im Alter von 0-14 Jahren (Katsch et al., 2004; Parkin et al., 1988; Parkin et al., 1998). Leukämien haben insgesamt nur einen Anteil von 3% an allen Malignomen auf der Welt (Parkin et al., 1999; Parkin et al., 2005). Die Rate für akute lymphatische Leukämien (ALL) wird in der Literatur mit 8-12% von allen Leukämien in jedem Lebensalter angegeben (Miller et al., 1995; Redaelli et al., 2005). Anders sieht dies jedoch im Kindesalter aus. In Westeuropa und anderen Industrienationen sind Leukämien die häufigste Malignomgruppe mit einem Drittel aller kindlichen Malignome (Katsch et al., 2004; Miller et al., 1995; Parkin et al., 1988; Parkin et al., 1998) mit einer Inzidenz von 35-50 Fällen pro einer Million Kinder im Alter von 0-14 Jahren (Parkin et al., 1988; Parkin et al., 1998). Bei der Verteilung der Häufigkeit eines speziellen Leukämietyps sieht es ebenfalls anders im Vergleich zur Gesamtbevölkerung aus. Die ALL nimmt 75-80% aller Leukämiefälle im Kindesalter in Anspruch (Miller et al., 1995; Pui, 1997; Redaelli et al., 2005) mit einer Inzidenz pro Jahr von 40 Fällen pro einer Million Kinder zwischen 0 und 14 Jahren (Katsch et al., 2004; Parkin et al., 1988; Parkin et al., 1998). Damit ist die ALL die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter mit einem Viertel aller kindlichen Malignome (Miller et al., 1995; Pui, 1997). Des Weiteren unterscheidet sich Krebs im Kindesalter von dem im Erwachsenenalter durch eine meistens höhere Proliferationsaktivität und einem wesentlich besseren Ansprechen auf eine Chemotherapie (Miller et al., 1995).

Heutzutage können mit den gängigen Chemotherapieprotokollen 80% der kindlichen ALL geheilt werden (Pui et al., 1998; Pui et al., 2004). In der Literatur sind sogar Remissionsraten von 100% mit einem Langzeitüberleben nach 10 Jahren mit 63% angegeben (Berg, 2000; Pui et al., 1998). In den gängigen Behandlungsprotokollen bei ALL werden vier Phasen der Behandlung beschrieben (Adamson et al., 1990; Chan, 2002; Pui, 1997; Pui et al., 1998; Pui, 2004):

1. Induktion zur Remission (Induktionstherapie)
2. Intensivierung der Therapie (Konsolidierungstherapie)
3. Aufrechterhaltung der Therapie (Erhaltungstherapie)
4. frühzeitige Prophylaxe des zentralen Nervensystems (ZNS-Prophylaxe)

Die Ziele der einzelnen Phasen und die eingesetzten Substanzen werden in der Literatur wie folgt beschrieben (Pui et al., 1998; Redaelli et al., 2005): In der Phase der Induktion zur Remission werden Kortison und andere Medikamente wie Vincristin und L-Asparaginase eingesetzt in der Hoffnung, so eine komplette Remission zu erreichen. Nach erreichter Remission schliesst sich dann die Intensivierungsphase an. Hierdurch soll eine Erhöhung des Langzeitoutcomes erreicht werden. In den in der Therapie erfolgreichen Protokollen werden Substanzen wie Methotrexat (MTX), 6-Mercaptopurin (6-MP), L-Asparaginase, Dexamethason, Vincristin, Doxorubicin, Thioguanin, Cyclophosphamid sowie Cytarabin eingesetzt (Evans et al., 1989). Im Anschluss folgt die Phase der Erhaltungstherapie. Diese soll laut Chan übrig gebliebene Tumorzellen abtöten (Chan, 2002). Hier wird unter anderem MTX mit einer wöchentlichen Gabe mit einer täglichen Gabe von 6-MP kombiniert und über einen Zeitraum von bis zu 3 Jahren bei Jungen und 2 Jahren bei Mädchen gegeben. Die vierte Phase betrifft das ZNS als die zweithäufigste Rezidivregion nach dem Knochenmark. Hier sind Medikamente mit einer hohen Penetration durch die Blut-Liquor-Schranke, intrathekale Medikamentenapplikation sowie Bestrahlung wirksam. Nahezu 100 % aller Kinder mit einer ALL werden heute in multizentrischen, prospektiven und randomisierten Therapieoptimierungsstudien in Deutschland behandelt (Schrappe et al., 2002).

Die oben genannten Protokolle basieren alle auf dem Einsatz von Antimetaboliten. Antimetabolite sind Substanzen, die als Strukturanaloga von Zwischenprodukten der Biosynthese diese oder die Zellteilung stören (Adamson et al., 1990). Relling bezeichnet die oben genannte Antimetabolitenkombination aus MTX und 6-MP als das Rückgrat der kontinuierlichen Chemotherapie bei Kindern mit ALL (Relling et al., 1999).

Anfang der 50iger Jahre, bevor es den Antimetaboliten 6-MP gab, lag die mittlere Überlebensrate von Kindern mit ALL bei 3-4 Monaten und einer Einjahresüberlebensrate von 30% (Elion, 1989). Durch die Einführung von 6-MP konnte die mediane Überlebenszeit damals auf 12 Monate verlängert werden und bei einigen wenigen Patienten konnte eine komplette Remission über Jahre erreicht werden (Elion, 1989). Zunächst wurden nach bakteriellen und tierexperimentellen Versuchen Anfang der fünfziger Jahre erste klinische Tests durchgeführt (Burchenal et al., 1953; Elion, 1989). Burchenal setzte 6-MP erstmals in der Therapie bei Kindern mit ALL ein. Er konnte damals von 45 an ALL erkrankten Kindern 15 innerhalb von 2-9 Wochen in die hämatologische und klinische Remission führen, bei weiteren zehn Patienten konnte er eine partielle Remission und eine klinische Verbesserung erreichen. Weiterhin beobachtete er als toxische Nebeneffekte eine Myelosuppression und bei

Hochdosisgabe Leukopenie, Anämie, Thrombozytopenie und Blutungen. Insgesamt konnte dadurch und durch weitere Therapieverbesserungen bis heute die Heilungsrate auf 80% gesteigert werden (Mehta et al., 2004; Pui et al., 1998). Neben den oben genannten Nebenwirkungen von 6-MP sind in der Literatur noch weitere wie Hepatotoxizität und Mucositis beschrieben (Adamson et al., 1990).

Um einen optimalen Chemotherapieeffekt zu erzielen, müsste man die ideale Dosierung eines Chemotherapeutikums erreichen, bei der ein Plasmaspiegel erreicht wird, der maximal viele Tumorzellen tötet und eine minimale Toxizität verursacht (Adamson et al., 1990). Dies ist nur durch eine pharmakokinetisch gesteuerte Behandlung möglich. Hierbei spielen viele Faktoren an der erreichten Wirkung eines Medikamentes mit (Adamson et al., 1990):

1. Absorption
2. Biotransformation
3. Katabolismus
4. Elimination
5. Interaktion mit anderen Wirkstoffen
6. Passage der Bluthirnschranke

Für das Chemotherapeutikum 6-Mercaptopurin gibt es Untersuchungen über die Absorption, die zeigen, dass die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe nur 16% der gegebenen Dosis beträgt. Dies wird auf den starken first-pass-Metabolismus in der Leber durch die Xanthinoxidase erklärt (Adamson et al., 1990). Für die Biotransformation von 6-MP werden intrazelluläre Kinasen benötigt, um es in Ribonukleotide und Desoxyribonukleotide umzuwandeln. Im Katabolismus wird 6-MP durch die Xanthinoxidase und durch die Thiopurin-S-Methyltransferase inaktiviert (Adamson et al., 1990; Evans et al., 2001). Die Elimination, die neben renaler und biliärer Exkretion auch die Biotransformation umfasst, ist für die Wirkdauer eines Medikamentes entscheidend, so dass eine verzögerte Eliminationsrate auch mit dem Risiko der Akkumulation und einem damit verbundenen höheren Risiko für toxische Effekte verbunden ist (Adamson et al., 1990). Die Medikamenteninteraktion ist für das 6-MP gut beschrieben für die Interaktion mit Allopurinol. Hier zeigen sich bei gleichzeitiger oraler Gabe beider Substanzen ein im Mittel fünfmal höherer Peak der Plasmakonzentration sowie eine fünfmal so große Fläche unterhalb der Plasmakonzentrationszeitkurve gegenüber der alleinigen 6-MP-Gabe. Adamson findet eine signifikante Erhöhung der hämatologischen Toxizität bei gemeinsamer Gabe (Adamson et al., 1990). Bei intravenöser Gabe beider

Substanzen wurde kein Unterschied gegenüber der alleinigen 6-MP-Gabe festgestellt. Adamson erklärt dies durch eine Umgehung des first-pass-Metabolismus bei intravenöser gegenüber der oraler Applikation. Er empfiehlt eine Dosisanpassung mit Reduktion der 6-MP-Dosis um 75% bei gleichzeitiger Allopurinolgabe bei oraler Applikation. Eine Passage der Blut-Hirn-Schranke wird in der Literatur für 6-MP mit 25% des Plasmaspiegels angegeben (Adamson et al., 1990).

Betrachtet man den Katabolismus durch TPMT, fällt auf, dass TPMT als Schlüsselenzym der Elimination im Stoffwechsel von 6-MP fungiert (Lennard et al., 1987; Schutz et al., 1996). Verschiedene genetische Polymorphismen bei an ALL erkrankten Kindern sind untersucht worden, darunter auch die Polymorphismen der TPMT. Hierbei zeigten sich bei 1 von 300 Personen eine homozygote und bei 10% aller Patienten eine heterozygote Genmutation (McLeod et al., 1994). Dies führt bei homozygot inaktivierenden Mutationen zu einer schnellen Akkumulation von 6-Thioguaninnukleotiden (6-TGN's), dem aktiven Metaboliten der Thioguanine Azathioprin, 6-Thioguanin und 6-MP, und damit zu einem hohen Risiko der Myelosuppression (Relling et al., 1999; Relling et al., 1999). Bei diesen Patienten muss eine Dosisanpassung auf 10 bis 15% der Ausgangsdosis erfolgen (Evans et al., 1991; Evans et al., 2001). Bei Patienten mit extrem hoher TPMT-Aktivität muss eine Erhöhung der Dosis erfolgen, da die 6-TGN-Konzentration mit der long-time-survival-Rate korreliert (Lennard et al., 1990). Somit spielen diese pharmakogenetischen Befunde durch die geänderte Metabolisierung von 6-MP eine Rolle in der Prognose der ALL.

Das Ziel dieser Arbeit ergibt sich aus diesem Zusammenhang. Neben der Etablierung einer Messmethode der TPMT-Aktivität, sollte auch eine Referenzierung von später gemessenen Werten von Kindern mit ALL möglich sein. Hierfür ist es notwendig, Referenzwerte durch Messung eines Normalkollektives zu schaffen. Um eine Nutzung im späteren klinischen Alltag möglich zu machen, mussten auch die Rahmenbedingungen wie Lagerungsorte und Lagerungszeiten untersucht und diskutiert werden.

3. Arbeitsmaterialien und Geräte

3.1. HPLC-Anlage

Die zur chromatographischen Analyse eingesetzte HPLC-Anlage setzt sich aus folgenden Einzelgeräten zusammen: Probenwechsler Intelligent Auto Sampler Mod. AS-4000, Doppelkolbenpumpe Intelligent Pump Mod. L-6200, Säulenthmostat Column Thermostat Mod. L-5052, Säulenthmostatsteuerung Column Oven Interface Mod. L-5025, HPLC-Steuerung Interface Mod. D-6000 und zur Registrierung des TPMT das Fluorescence-Spectrophotometer F-1050, alle Geräte Fa. Merck/Hitachi, Darmstadt.

Zur Steuerung, Programmierung und Datenverarbeitung wurde die HPLC-Anlage mit einem Personalcomputer mit Windows NT als Betriebssystem verbunden. Die nötige Software lieferte das installierte Programm „D-7000 HPLC-System-Manager“ der Fa. Merck, Darmstadt.

3.2. Säulen

Als analytische reversed-phase Säule diente eine Li Chro CART 125-4 mm Trennsäule mit Li Chrospher 100 RP 18 Säulenmaterial, Partikelgröße 5 µm mit manu-CART Verschraubung. Als Vorsäule wurde eine Li-Chro-CART 4-4 mm Kartusche, ebenfalls mit Li Chrospher 100 RP 18 Säulenmaterial, Partikelgröße 5 µm, eingesetzt. Beide Säulen, Trenn- und Vorsäule, sind von der Fa. Merck, Darmstadt. Um die Präzision der Messungen zu garantieren, wurden beide Säulen in regelmäßigen Abständen ausgetauscht.

3.3. Arbeitsgeräte

Zentrifuge (Mod. Rotixa/RP, Fa. Hettich); Hochgeschwindigkeitszentrifuge (Mod. EBA 12, Fa. Hettich); Waage (Mod. Type 1801, Fa. Sartorius, Messbereich 0,1 mg bis 110 g); Waage (Mod. AB 204, Fa. Mettler Toledo, Messbereich 0,1 mg bis 210 g); pH-Meter (Mod. 720A,

Fa. Orion); Magnetrührer (Mod. Combimag, Fa. IKA); Vortex-Mischer (Mod. Vibrofix VF 1 Electronic, Fa. IKA); Vortex-Mischer (Mod. Reax 1 DR, Fa. Heidolph); Thermoblock (Mod. Dri-Block DB-3, Fa. Techne); Thermomixer (Mod. 5436, Fa. Eppendorf); Vakuumkonzentrator (Mod. Concentrator 5301, Fa. Eppendorf); Cell-Counter (Mod. SF 3000, Fa. Sysmex); Ultraschall-Zelldisruptor (Mod. Sonifier Cell Disruptor B15, Fa. Branson); Filtrationssystem (Mod. SM 165 10, Fa. Sartorius) mit Membranfiltern (Nitrocellulose-Filter mit 0,45 µm Porengröße und einem Durchmesser von 50 mm, Fa. Millipore); Wasserbad (Mod. Thermostat 761, Fa. Eppendorf, Regulationsbereich 20°C bis 60°C); Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5 ml (Mod. Nr. 72690, Fa. Sarstedt); 100 µl, 200 µl, 10 µl - 100 µl volumenvARIABLE, 200 µl – 1000 µl volumenvARIABLE Kolbenhubpipetten der Fa. Eppendorf; Pipettenspitzen der Fa. Brand.

3.4. Chemikalien

6-Thioguanine (2-Amino-6-Mercaptopurine) nur Charge Nr. Lot 117H0559, FW 167,2, mind. 98%, Sigma Nr. A 4882, Fa. Sigma / Aldrich; **6-Methylthioguanine** (2-Amino-6-Mercaptopurine) FW 181,2, 95-97%, Sigma Nr. A 9546, Fa. Sigma / Aldrich; **SAM** (S-(5'-Adenosyl)-L-Methionine Chloride) FW 434,9, approx. 70%, Sigma Nr. A 7007, Fa. Sigma / Aldrich; **HBSS** (Hanks' balanced Salt Solution) ohne Phenolrot und Sodium bicarbonate, 9,8g/l, Sigma Nr. H 1387, Fa. Sigma / Aldrich; **Sodium Bicarbonate Solution** (7,5 %, Sigma Nr. S 8761) Fa. Sigma / Aldrich; **Sodium Hydroxide Solution** (Titrisol), 1 N, 40,00g NaOH für 1000ml, Merck Nr. 9956, Fa. Merck; **Hydrochloric Acid** (Titrisol), 0,1 N, 3,646g HCl für 1000ml, Merck Nr. 9973, Fa. Merck; **Potassium Dihydrogen Phosphate** zur Analyse, FW 136,09, mind. 99,5% Merck Nr. 1.04873.1000, Fa. Merck; **Di-Sodium Hydrogen Phosphate** zur Analyse, FW 141,96, mind. 99% Merck Nr. 6580.0500, Fa. Merck; **Acetonitrile gradient grade für die Flüssigkeitschromatographie**, FW 41,05, mind. 99,9%, Merck Nr. 1.00030.2500, Fa. Merck; **Tetrahydrofuran**, FW 72,11, mind. 99%, Sigma Nr. T 5267, Fa. Sigma / Aldrich; **Chloroform** HPLC grade, FW 119,38, mind. 99,9%, Aldrich Nr. 36,692-7, Fa. Sigma / Aldrich; **2-Propanol** HPLC grade, FW 60,10, 99,5%, Aldrich Nr. 27,049-0, Fa. Sigma / Aldrich; **PBS-Puffer, steril, autocl.**, pH 7,2 bei 25°C, Sodium chloride 150mM und Sodium phosphate 150mM, Sigma Nr. P 0261, Fa. Sigma / Aldrich; **Aqua destillata** (laboreigenes Aqua destillata, filtriert durch einen 0,45 µm Membranfilter), **Ficoll-Hypaque** (Mono-Poly Resolving Medium): ICN Best.Nr. 1698049, Fa. ICN Biochemicals.

3.5. Blutproben für Standards

Die Blutproben für Standards zur Eichung der Messläufe und für Intra- und Interassay-Qualitätskontrolle wurden aus nicht zytostatisch vorbehandeltem Spenderblut gewonnen.

4. Probanden

4.1. Probanden für Messungen zur Etablierung der Methode

Die Blutproben für diesen Teil sind von mir den jeweiligen Probanden abgenommen worden.

4.1.1. Probanden zur Messung der Wiederfindungsrate

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate standen zehn gesunde Probanden, fünf Frauen und fünf Männer, im Alter zwischen 20 und 45 Jahren zur Verfügung. Hierbei wurde den Probanden Blut abgenommen und unmittelbar ein RBC-Lysat hergestellt. Diese Lysate wurden bei -30°C eingefroren und nach 1, 8, 13 und 15 Tagen sowie nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und 12 Monaten untersucht.

4.1.2. Probanden zur Vergleichsmessung bei unterschiedlicher Lagerungszeit des Vollblutes

Zur Bestimmung der Enzymaktivität bei verschieden langer Lagerungszeit von Vollblut bei +5°C wurde einerseits Vollblut der Probanden aus 4.1.1. sofort und nach 5, 7, 12 und 14 Tagen zu RBC-Lysat verarbeitet, bei -30°C eingefroren und am Folgetag untersucht sowie von sieben gesunden Probanden, 3 Frauen und 4 Männern, Vollblut abgenommen, sofort und nach 1 und 2 Tagen zu RBC-Lysat verarbeitet und dann in einer Messserie untersucht.

4.1.3. Probanden zur Vergleichsmessung bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur (-30°C und -80°C)

Zum Enzymaktivitätsvergleich bei -30°C und -80°C Lagerungstemperatur wurde von acht Probanden aus 4.2. Vollblut zu RBC-Lysat verarbeitet und bei -30°C und -80°C eingefroren. Dann wurde eine Woche nach Verarbeitung RBC-Lysat, welches bei -30°C eingefroren war, und 7 Wochen nach der Verarbeitung RBC-Lysat, welches bei -30°C und -80°C eingefroren war, untersucht.

4.2. Probanden im Lebensalter von 0 bis 18 Jahren zur Bestimmung der Referenzwerte der Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT)

Zur Bestimmung der Referenzwerte im Alter von 0 bis 18 Jahren wurde die Aktivität der TPMT von 346 kaukasischen Probanden gemessen. „Kaukasisch“ ist dabei aus dem angelsächsischen Bereich übernommen, wo es gebräuchlich für Menschen mit weißer Hautfarbe ist. Im Pons-Wörterbuch wird „Caucasian“ unter anderem auch mit „Weißer“ übersetzt (Breitsprecher, 1998). Die Blutproben wurden im Rahmen von Blutentnahmen für Routineuntersuchung der Probanden zusätzlich in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätskliniken des Saarlandes gewonnen.

Die Ausschlusskriterien für Probanden waren:

- 1) Erhalt einer Bluttransfusion in den letzten 3 Monaten
- 2) Somatische Erkrankung.

Die Altersverteilung gestaltete sich wie in Abb. 4.1. dargestellt. Die geschlechtsspezifische Verteilung ist in Abb. 4.2. zu sehen.

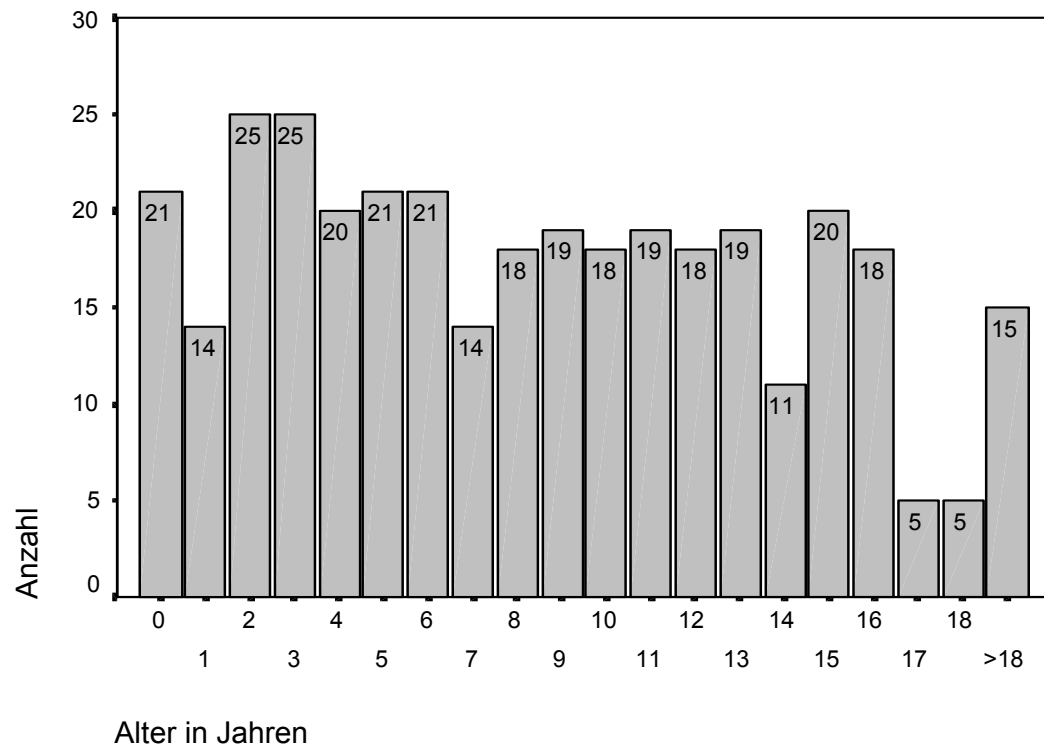


Abb. 4.1.: Altersverteilung der Probanden aus 4.2.

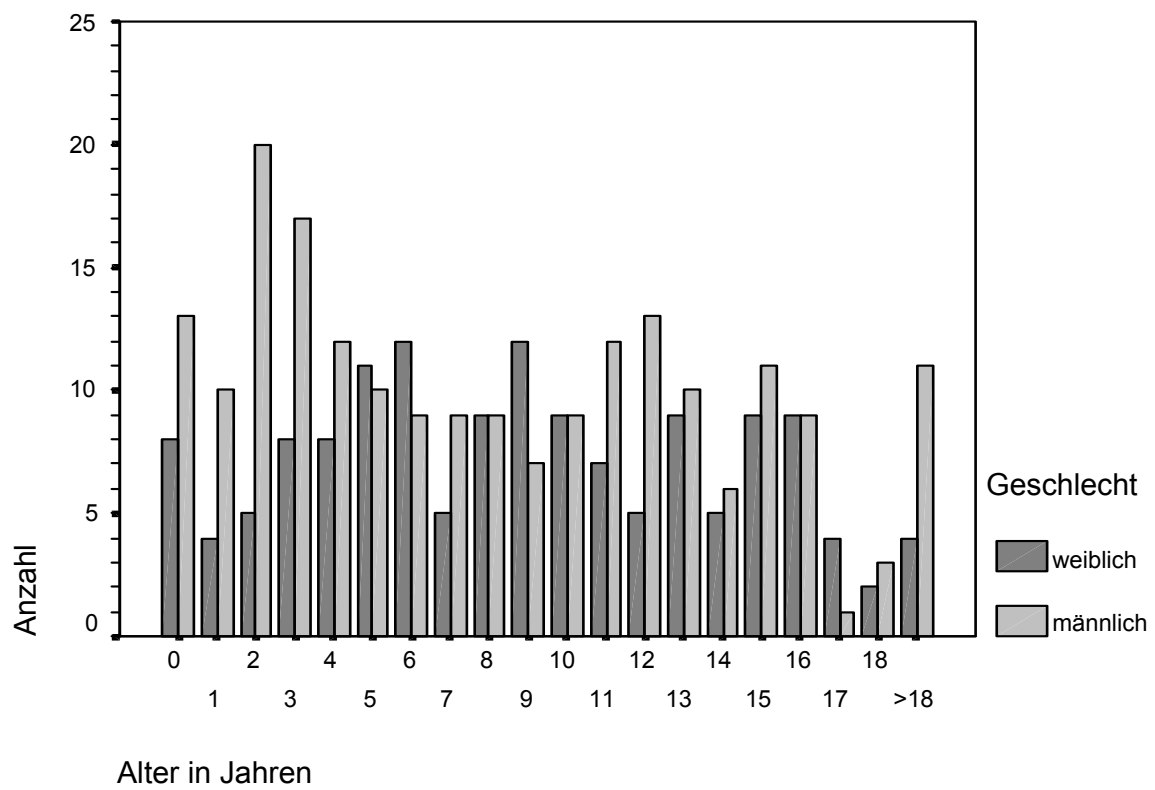


Abb. 4.2. geschlechtsspezifische Altersverteilung der Probanden aus 4.2.

4.3. Probanden zur Testmessung der Aktivität in anderen Blutzellen

4.3.1. Bestimmung der Aktivität in Knochenmarkszellen

Als Probanden standen zwei Patienten (männlich, 16 Jahre; männlich, 10 Jahre) zur Verfügung, bei denen eine Knochenmarkspunktion durchgeführt worden war.

4.3.2. Bestimmung der Aktivität in Leukämiezellen

Als Probanden standen drei Patienten (männlich, 5 Jahre; männlich, 10 Jahre; weiblich 9 Jahre) mit einer Hyperleukozytose bei Leukämie zur Verfügung.

4.3.3. Vergleich der Aktivität in Leukämiezellen und Knochenmarkszellen

Als Proband stand ein Patient (männlich, 10 Jahre) zur Verfügung, der sowohl in 4.3.1. als auch in 4.3.2. als Proband gemessen wurde.

5. Methodik

5.1. Probenentnahme und Herstellung der RBC – Lysate

Nach Entnahme der Blutproben mittels einer Butterfly-Kanüle in EDTA-Röhrchen wurden diese umgehend 10 min bei 1700 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, anschließend der Überstand bestehend aus Plasma und Buffy-coat abpipettiert und verworfen. Der verbleibende Rückstand wurde dann mit dem gleichen Volumen an HBSS gewaschen und erneut 10 min bei 1700 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde der Rückstand mit dem vierfachen Volumen eines 0,02 M Phosphatpuffers pH 7,4 (114 mg KH_2PO_4 + 300 mg Na_2HPO_4 in 80 ml Aqua dest., mit 1N NaOH auf pH 7,4 eingestellt, auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt, 0,45 μm filtriert) verdünnt (Kroplin et al., 1998). Nun wurden 0,4 ml des Gemisches aus Rückstand und 0,02 M Phosphatpuffers in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und bis zur Analyse bei -30°C eingefroren.

Die Herstellung der Standard-Lysate erfolgte auf die gleiche Weise wie die Herstellung der RBC-Lysate. Als Spender fungierte immer die gleiche gesunde Person.

5.2. Probenentnahme und Herstellung der Leukämiezellen- und Knochenmarks-Lysate

Nach Entnahme der Blutproben mittels einer Butterfly-Kanüle bzw. nach Knochenmarkspunktion in Heparin-Röhrchen wurden die Proben unmittelbar in das Blutzelllabor der Klinik für Innere Medizin I - Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie der Universitätskliniken des Saarlandes gebracht. Hier erfolgte die Isolierung der Leukämiezellen bzw. der Knochenmarkszellen wie folgt: Die Proben wurden mit PBS-Puffer (pH 7,2 bei 25°C) im Volumenverhältnis 1:1 in einem spitzen Röhrchen gemischt. Nun wurde vorsichtig mit einer Spritze Fikoll im Volumenverhältnis 1:2 unterschichtet. Anschließend wurde das Spitzröhrchen 25 Minuten bei 2000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert. Danach finden sich 4 Schichten in dem Röhrchen. Von oben nach unten entsprechen die Schichten dem Serum, der mononukleären Zellschicht, dem Fikoll und der roten Zellreihe. Die Schicht der mononukleären Zellen wurde dann vorsichtig vom Rand

her abpipetiert. Nun wurde die Schicht der mononukleären Zellen noch mit PBS-Puffer gewaschen. Hierfür wurde die Schicht mit PBS-Puffer im Volumenverhältnis 1:2 versetzt und 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipetiert und verworfen. Der Waschvorgang wurde noch ein zweites Mal durchgeführt. Abschließend wurde noch mal PBS-Puffer im Volumenverhältnis 1:2 hinzugefügt.

Nun wurde dieses Gemisch von mir nochmals 10 Minuten bei 2000 Umdrehungen in der Minute zentrifugiert, der Überstand abgehoben und dann der verbleibende Rest mit dem 0,02 molaren Phosphatpuffer im Volumenverhältnis 1:4 gemischt. Dieses Gemisch wurde dann als Leukämiezellen-Lysat bzw. Knochenmarks-Lysat bei -30°C eingefroren.

5.3. Aufbereitung der Proben

Nach langsamem Auftauen der RBC-Lysate und eines Standard-Lysats im Wasserbad am Tag der Analyse wurden diese folgendermaßen für die HPLC-Analyse vorbereitet (Kroplin et al., 1998):

Zur Entfernung der Zellmembranen wurden die aufgetauten RBC-Lysate und das Standard-Lysat 10 min bei 14400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand zur Weiterverarbeitung abpipetiert. Aus den RBC-Lysaten wurde dann der Hb bestimmt.

Zur Herstellung der 3 Standards werden im ersten Schritt 40 µl der Stocksolution 6-MTG (10 mg 6-MTG in 4 ml 0,1M NaOH gelöst, mit 96 ml Aqua dest. 0,45µm filtriert verdünnt, also 100 µg/ml) mit 760 µl Aqua dest. 0,45µm filtriert vorverdünnt. Von dieser Vorverdünnung wurden 500 µl erneut mit Aqua dest. im Verhältnis 1:1 verdünnt. Von dem entstandenen 25ng/10µl-Lysat wurden 50 µl mit 200 µl des Überstandes des Standard-Lysats zum Substrat-Blank, das somit eine Konzentration von 25ng/50µl Lysat aufwies, gemischt. Jeweils 50 µl des Substratblanks wurden mit 50 µl 0,2 M KH₂PO₄ pH 7,4 (0,45µm filtriert) und 150 µl Aqua dest. 0,45µm filtriert in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß versetzt. Jetzt wurden die 3 Standards 10 sec. auf einem Vortex-Mischer gemischt.

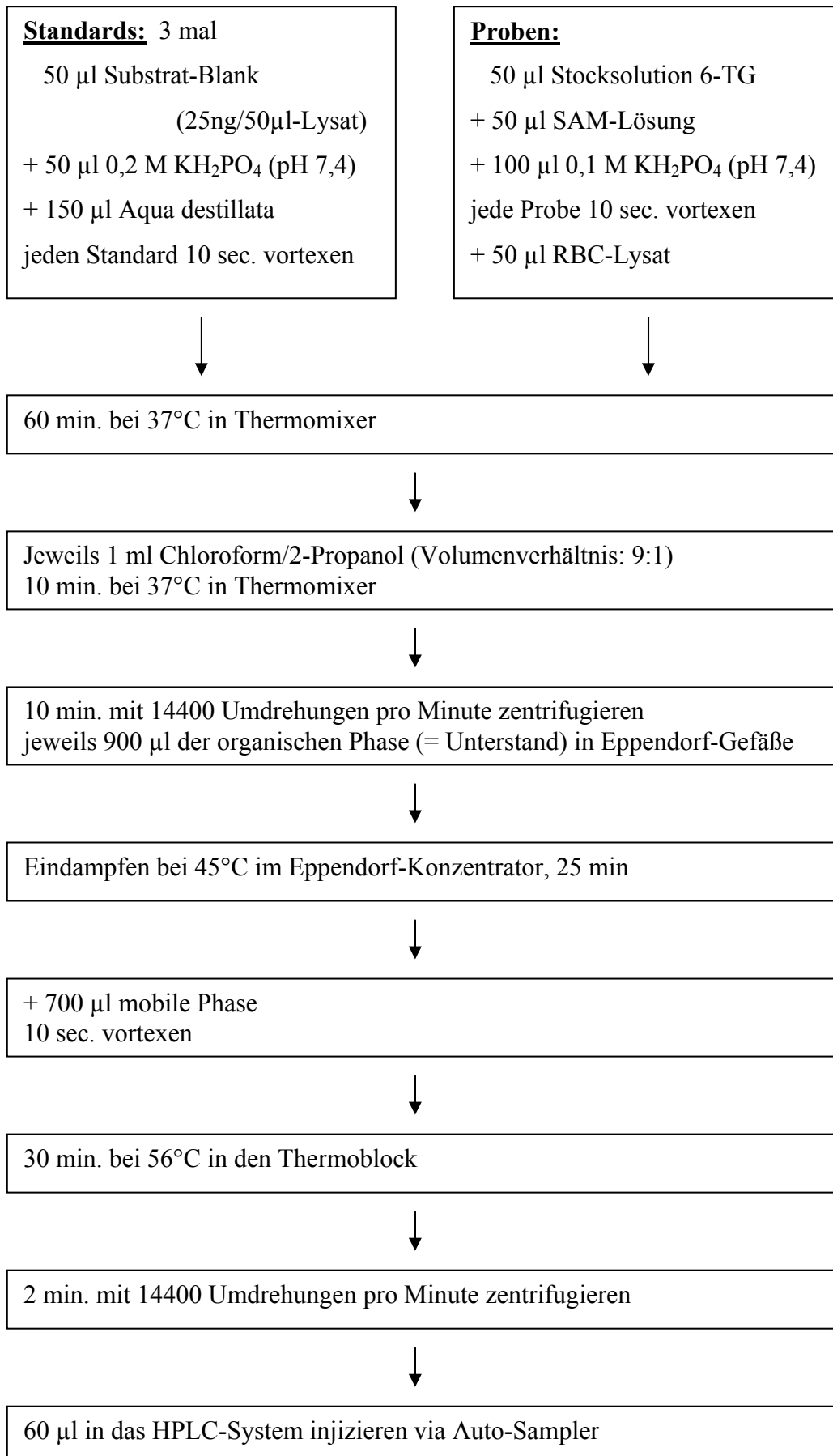
Die Leukämiezellen- bzw. Knochenmarks-Lysate wurden nach Auftauen zur Zellzählung ins Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes gebracht. Anschließend wurden zur

Entfernung der Zellmembranen die Lysate mit dem Intervall-Ultraschall 40 mal beschallt, um die Zellmembranen zu zerstören. Anschließend wurden die beschallten Lysate bei 14400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und der Überstand zur Weiterverarbeitung abpipettiert. Im Weiteren wurden die Proben wie die RBC-Lysate weiterverarbeitet.

Der erste Aufbereitungsschritt der RBC-Lysate war das Herstellen der Stocksolution 6-TG, die nur zwei Stunden stabil war (Kroplin et al., 1999). Hierfür wurden 1,5 mg 6-TG in 1 ml 0,1 M NaOH gelöst, mit 1 ml 0,1 M HCl neutralisiert und mit 1 ml 0,02 M Phosphatpuffer (pH 7,4) versetzt. Für jede Probe wurden jeweils 50 µl dieser Stocksolution 6-TG, 50 µl SAM-Lösung (25 mg S-Adenosyl-L-Methionine Chloride in 25 ml Aqua dest. gelöst und in 1ml Portionen bei -30°C eingefroren, bei Bedarf eine Portion aufgetaut und mit 9 ml Aqua dest. gemischt, also 100 µg/ml, dann bis zur Analyse erneut in Portionen eingefroren) und 100 µl 0,1 M KH_2PO_4 pH 7,4 (0,45µm filtriert) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und anschließend auf einem Vortex-Mischer 10 sec. gemischt. Hiernach wurde die enzymatische Reaktion durch Hinzugabe von 50 µl des Überstandes des RBC-Lysats gestartet.

Nun wurden die Standards und die Proben im Thermomixer 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jeweils 1 ml eines Chloroform/2-Propanol-Gemisches (Volumenverhältnis: 9:1) als organische Phase hinzugegeben und weitere 10 min im Thermomixer bei 37°C geschüttelt. Die enzymatische Reaktion in den Probengefäßen wurde dadurch gestoppt. Jetzt wurden Proben und Standards 10 min bei 14400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, dann jeweils 900 µl des Unterstandes in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und diese dann im Eppendorf-Konzentrator bei 45°C eingedampft. Nun gibt man jeweils 700 µl der mobilen Phase hinzu, um das 6-MTG wiederaufzunehmen. Um die mobile Phase herzustellen, wurden 5,444 g KH_2PO_4 in 1700 ml Aqua dest. gelöst, mit 100 ml Acetonitril und 80 ml Tetrahydrofuran vermischt, auf den pH 6,2 eingestellt, mit Aqua dest. auf 2000 ml aufgefüllt und 0,45 µm filtriert. Nach Hinzufügen der mobilen Phase wurden Proben und Standards auf dem Vortex-Mischer je 10 Sekunden gemischt und dann 30 min in den Thermoblock bei 56°C gestellt. Zum Schluss wurden die Standards und Proben nochmals 2 min bei 14400 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Messung erfolgte umgehend im Anschluss der Aufarbeitung.

Zu 5.3.: Schematische Darstellung:

5.4. Messung

5.4.1. Schematisches Prinzip einer HPLC-Anlage

Die einzelnen Schritte im Verlauf einer chromatographischen Messung sind schematisch in Abb. 5.1. dargestellt. Die Eingabe der zu messenden Probe erfolgt durch den Auto-Sampler (Modul 1). Durch das Dosierventil (Modul 2) wird die Probe unter konstantem Druck, Fluss und Temperatur im Oven Interface (Modul 3) durch die Vorsäule (Modul 4) und die Hauptsäule (Modul 5) geleitet. Nach Durchlaufen der Hauptsäule misst der fluoreszenzspektrophotometrische Detektor (Modul 6) die Fluoreszenzunterschiede und leitet diese an die Steuereinheit (Modul 7) weiter.

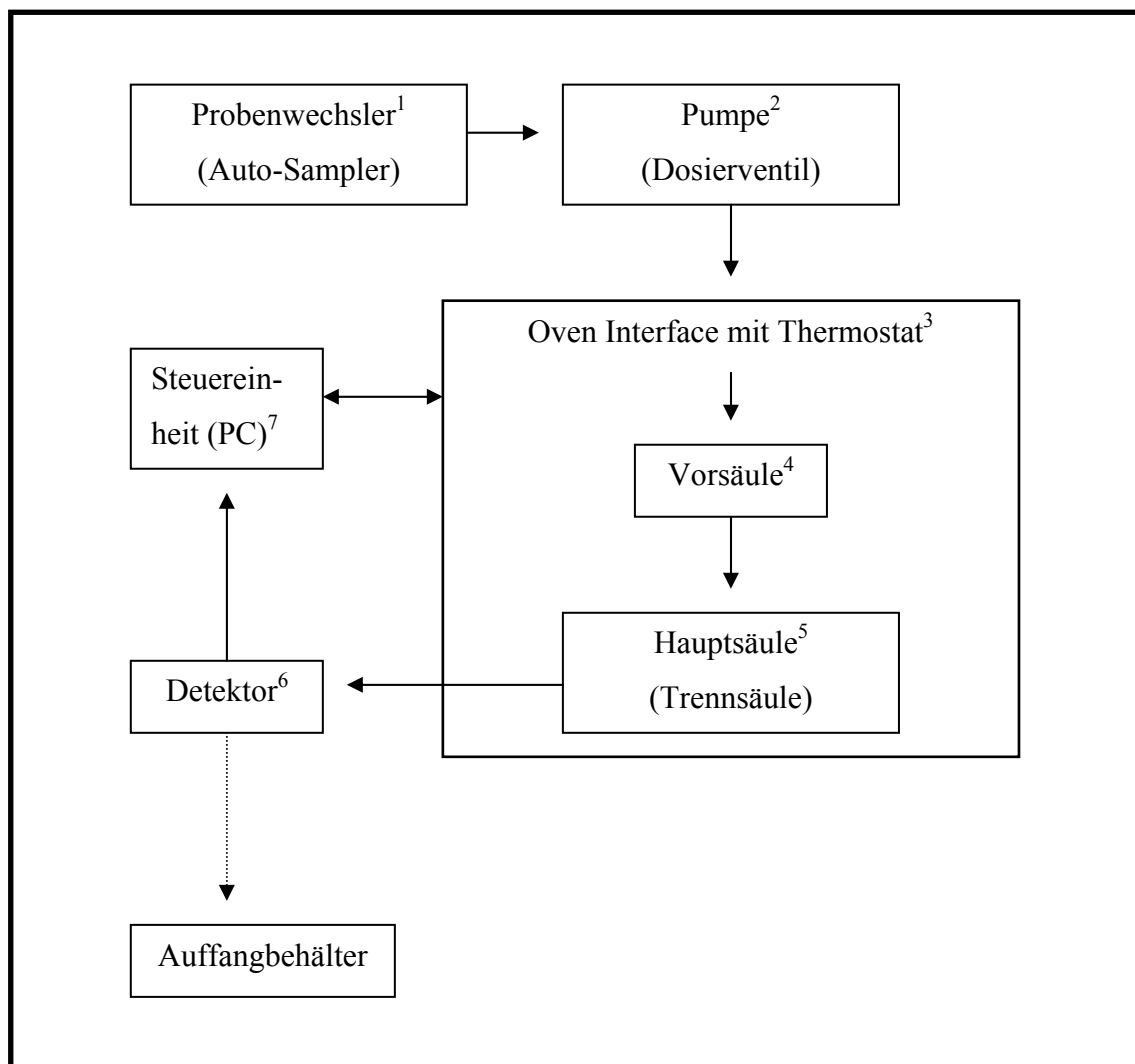


Abb. 5.1.: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage zur isokratischen Arbeitsweise

In Abb. 5.2. ist die zur Messung benutzte Anlage, die aus den in Kapitel 3.1. aufgeführten Geräten besteht, mit der entsprechenden Zahlenbeschriftung abgebildet.

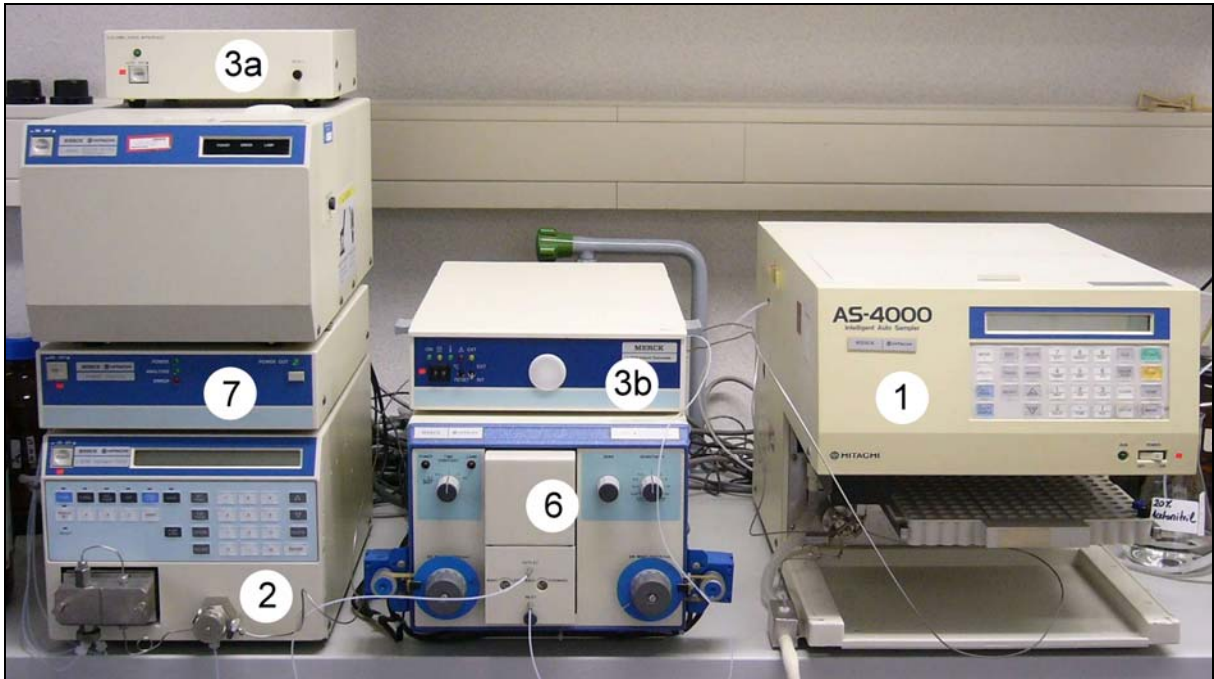


Abb. 5.2.: Foto der benutzten HPLC-Anlage (1: Auto-Sampler, 2: Pumpe, 3a: Oven-Interface, 3b: Thermostat mit Vorsäule und Hauptsäule, 6: Detektor, 7: Interface der PC-Steuereinheit)

5.4.2. Messparameter und Optionen

Die 6-MTG-Messung erfolgte mit der in Kapitel 3.1 beschriebenen HPLC-Anlage, die mit den in Kapitel 3.2 genannten Säulen ausgestattet war. Als mobile Phase wurde bei der Laufdurchführung ein tertiäres Fließmittel aus KH_2PO_4 , Acetonitril und Tetrahydrofuran in einem Volumenverhältnis von 91/5/4 mit einem pH von 6,2 zum Eluieren eingesetzt (Kroplin et al., 1998). Aufgrund der konstanten Zusammensetzung des Fließmittels liegt eine isokratische Arbeitsweise der HPLC-Anlage vor (Schwedt, 1996). Das Fließmittel wurde wie in Kapitel 5.3. mindestens einen Tag vor der Messung hergestellt, um Blasenbildung im HPLC-System zu vermeiden.

Um ein optimal äquilibriertes Milieu in der Säule zu erreichen, wurden vor jeder Kalibration jeweils 3 Vorläufe gemacht.

Vor jeder Messserie wurde ein Noise-Test durchgeführt. Dabei wurde das Grundrauschen des Detektors identifiziert, um später das Grundlinienrauschen von kleinen Peaks unterscheiden zu können. Die Kalibration erfolgte erst nach akzeptablen Noisewerten laut Gerätehersteller-Angaben.

Das 6-MTG wurde durch den Fluoreszenzdetektor bei einer Excitationswellenlänge von 315 nm und einer Emissionswellenlänge von 390 nm gemessen.

Das mittels Auto-Sampler injizierte Volumen betrug sowohl bei Standardläufen wie zur Messung der Proben 60 µl. Die gewählte Diagrammdarstellung der Ordinate im HPLC-Manager betrug -2,0 bis maximal 18 mV.

Der Pumpenbetriebsdruck lag während eines Laufes bei 125 bar, während der Spülphase nach dem 6-MTG-Peak mit Acetonitril kam es zu einem leichten Druckabfall. Der Flow betrug 1,2 ml/min. Die thermisch geregelte Messtemperatur lag bei +36°C und es wurde ausschließlich bei dieser Temperatur gemessen.

Die Laufzeit betrug 15 min pro Probe, um eine optimale Spülung des Systems zu ermöglichen.

HPLC-Modul:	AS-4000	L-6200	L-5052	HPLC-D7000	F-1050
	Injektions- volumen (µl)	Betriebsdruck (bar)	Betriebs- temperatur (°C)	Ordinate (mV)	Wellenlänge Ex. / Em. (nm)
	60	125	36	-2 bis 18	315 / 390

Tab. 5.1.: Einstellungen des HPLC-Systems bei Messung der Aktivität der Thiopurin-S-Methyltransferase

5.4.3. Beschreibung eines Chromatogramms

Die vom Detektor an die PC-Steuereinheit weitergeleiteten Fluoreszenzunterschiede ergeben das chromatographische Elutionsprofil, schematisch dargestellt in Abb. 5.3.. Im Folgenden werden die zur Beurteilung eines solchen Profils und der nachfolgend abgebildeten Chromatogramme einige Grundbegriffe erläutert:

Die Retentionszeit t_R entspricht der Zeit von der Injektion bis zum Erreichen des Peakmaximums. Die absolute Peakhöhe h beschreibt den Abstand zwischen Basislinie und Peakmaximum. Bei den vorliegenden Messungen wurde die Probenkonzentration von 6-MTG über die EDV-berechnete Peakfläche A ermittelt.

Fällt man das Lot vom Peakmaximum auf die Basislinie, so erhält man den Abstand zur Peakbasis nach links (w_a) bzw. nach rechts (w_b). Die Peaksymmetrie P_s wird dann durch das Verhältnis von $w_a : w_b$ dargestellt. Wenn $P_s < 1$, spricht man von einem nach vorne asymmetrischen Peak (fronting), wenn $P_s > 1$, ergibt sich ein nach hinten asymmetrischer Peak (tailing).

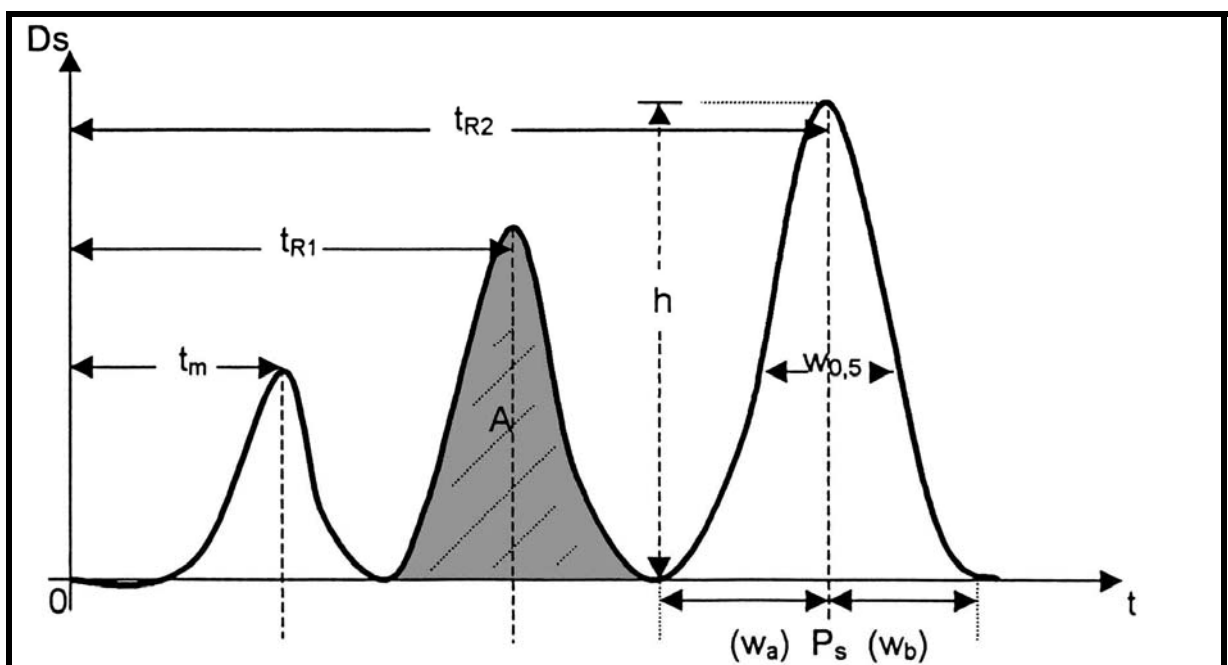


Abb. 5.3.: Schematische Darstellung eines Chromatogramms. D_s = Detektorsignal. t = Zeit. t_m = Verweilzeit der mobilen Phase. t_{R1}/t_{R2} = Retentionszeiten gelöster Substanzen. $w_{0,5}$ = Peakbreite in halber Peakhöhe. Restliche siehe Text.

5.4.4. Quantitative Analyse

Zur Bestimmung der Konzentration des 6-MTG wurde die Peakflächenberechnung (area calculation method) als mathematische Option benutzt. Dabei wird die gesamte Fläche A eines Peaks in Relation zu einer Referenzfläche gesetzt, die einer definierten Konzentration entspricht.

Zur Ermittlung dieser Referenzfläche wurde vor jeder Messung die HPLC-Anlage mit einem Standard mit einer definierten Konzentration an 6-MTG (Standard aus 5.3.) geeicht und die dabei ermittelte Peakfläche als Referenzfläche eingesetzt.

Die Datenermittlung erfolgte anhand eines berechneten Response-Faktors (R-factor), der der Steigung der Kalibrationskurve entspricht, also dem Auftragen der Peakfläche A gegen die Konzentration c_s des Standards. Die Kalibrationskurve ist in Abb. 5.4. abgebildet.

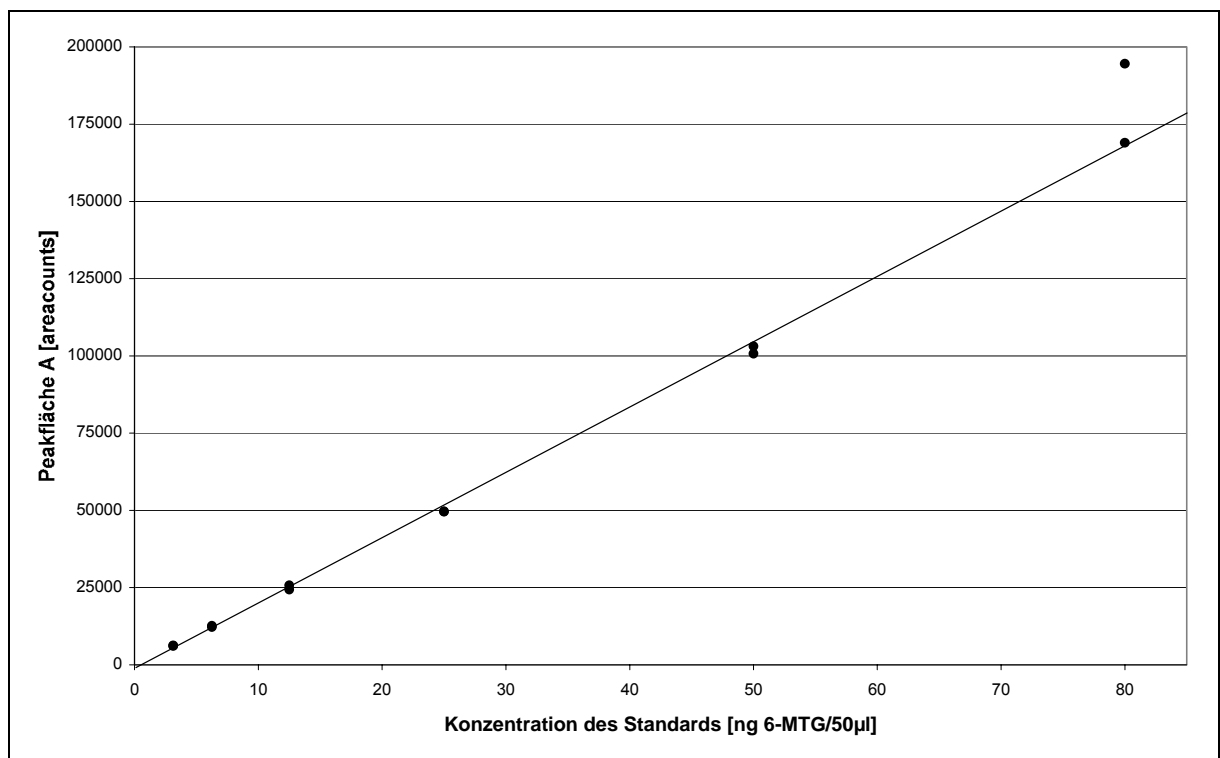


Abb. 5.4.: Kalibrationskurve zur Bestimmung des Response-Faktors (x-Achse: Konzentration des Standards c_s in [ng 6-MTG/50µl]; y-Achse: Peakfläche A in [areacounts])

Am Anfang und am Ende jeder Messungsserie wurde zur Bestimmung des Intra- und Interassay-Variationskoeffizienten ein Standard gesetzt. Zur Präzision der Meßmethode siehe Kap. 5.5.

Die Standards aus 5.3. haben eine Konzentration von 275,9 nmol 6-MTG/100ml.

Vor der Kalibration erfolgten immer drei (Standard-)Vorläufe, um Kontaminationen durch „Rest-Substanzen“ aus vorausgegangenen Meßläufen auszuschließen und um ein einheitliches Milieu in der Säule zu erreichen.

5.4.5. Qualitative Analyse

Für die qualitative Analyse führte ich eine Messserie durch, in der ich das für den Standard benutzte Probandenblut als Testblut unter Normalbedingungen (d.h. Aufbereitung wie Probe aus 5.3.), ohne die Zugabe von SAM, ohne die Zugabe von 6-TG und ohne die Zugabe von 6-TG und SAM analysierte. Hierbei ergab sich folgendes Ergebnis:

	Standard	Normal- bedingungen	Ohne die Zugabe von SAM	Ohne die Zugabe von 6-TG	Ohne die Zugabe von 6-TG und SAM
Konzentration [nmol 6-MTG/100ml Lysat]	275,90	259,42	69,70	14,89	15,20
t_R [min]	3,02	2,94	2,94	2,93	2,94

Tab. 5.2.: Ergebnisdarstellung zur qualitativen Analyse

Man erkennt, dass die Konzentration davon abhängig ist, ob genug Methylgruppen vorliegen (SAM als Spender) und ob Substrat (6-TG) vorliegt. Anhand der Retentionszeiten t_R , die auch bei allen anderen Messungen nur gering differierten, ist zu erkennen, dass die Ermittlung der t_R der qualitativen Analyse des 6-MTG dient. Die ermittelte Retentionszeit t_R um 3 Minuten bestätigt die von Kröplin bestimmte Retentionszeit (Kroplin et al., 1998).

5.5. Validierung der Meßmethode

Der Messbereich umfasste eine Bandbreite an detektierten 6-Methylthioguanin (6-MTG) im RBC-Lysat von 21,198 bis 1097,690 nmol 6-MTG/100ml Lysat. Die durch Kalibration ermittelte Empfindlichkeit der Methode betrug 0,001 nmol 6-MTG/100ml Lysat.

Die Quantifizierung mittels externen Standards erfolgte über die Peakfläche per Software-unterstützter Berechnung im DV-Programm D-7000 HPLC-System-Manager.

Die Nachweisgrenze, also die niedrigste Konzentration, die vom Nullwert differenziert werden kann, um eine quantitative Bestimmung zu ermöglichen, betrug 16,910 nmol 6-MTG/100ml Lysat.

Die Präzisionskontrolle ergab im Intraassay bei einer Eichung mit 275,9 nmol 6-MTG/100ml Lysat einen Variationskoeffizienten von 2,16 %. Im Interassay lag der Variationskoeffizient bei einer Eichung mit 275,9 nmol 6-MTG/100ml Lysat bei 1,27 %.

In den Vorläufen wurden die detektierten 6-MTG Peaks symmetrisch mit steilem An- und Abstieg ohne Interferenzen anderer Peaks und ohne Pre- oder Posttailing im Chromatogramm dargestellt (siehe Abb. 5.5. und Abb. 5.6.).

Die in den beiden Abbildungen zu sehenden Peaks zwischen 5 und 10 Minuten entstehen durch die Spülung des HPLC-Systems und sind für meine Untersuchung ohne Bedeutung.

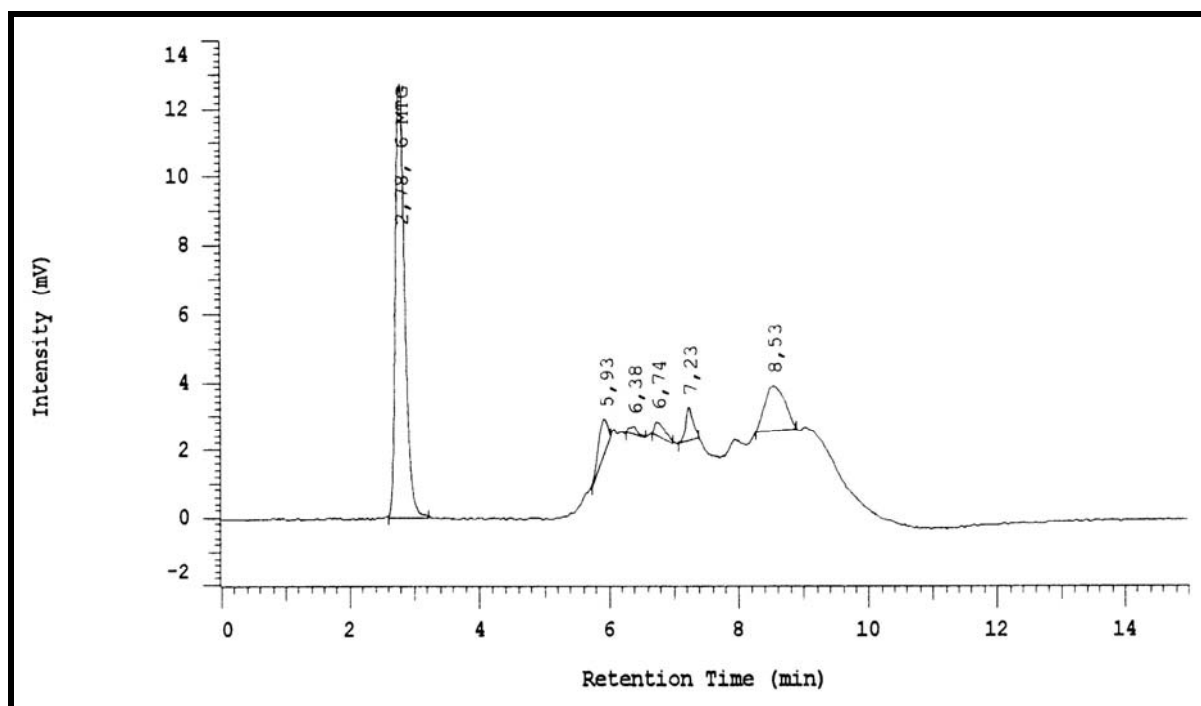


Abb. 5.5.: Chromatogramm eines zur Bestimmung der Retentionszeit t_R verwendeten Standards; $[c] = 275,9$ nmol 6-MTG/100ml Lysat; 6-MTG-Peak bei 2,78 min.

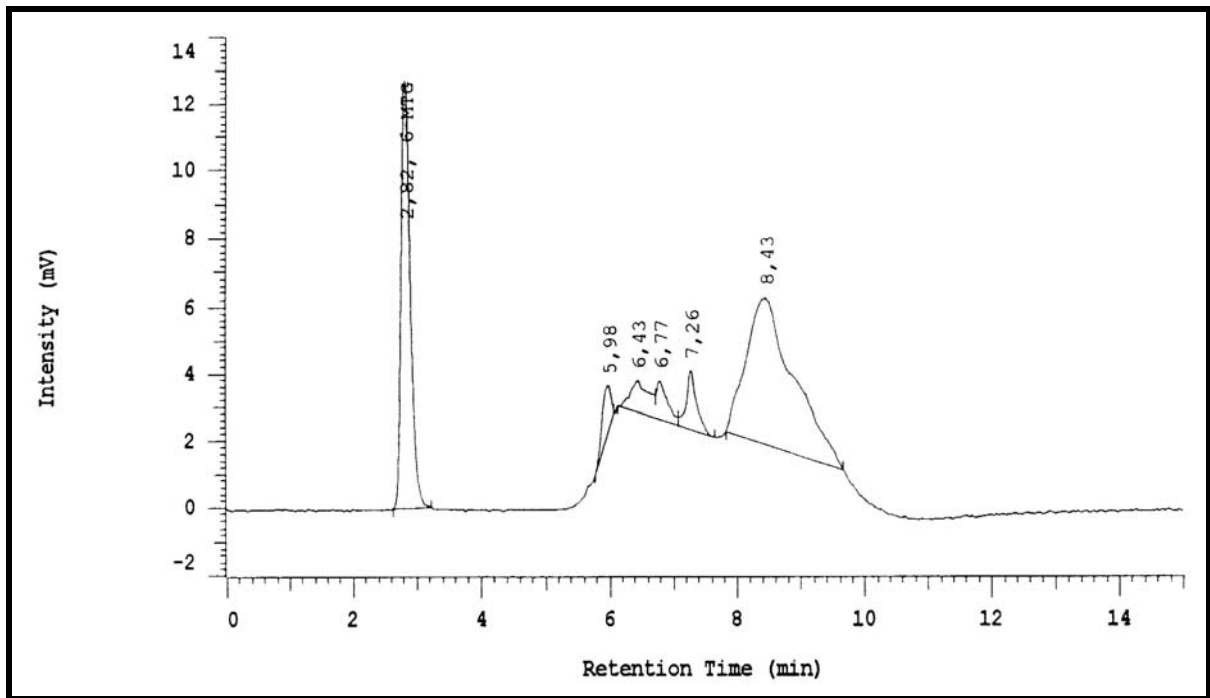


Abb. 5.6.: Chromatogramm eines Kontrollstandards aus dem Lauf von Abb. 5.5.; $[c] = 275,9 \text{ nmol 6-MTG/100ml Lysat}$; 6-MTG-Peak bei 2,82 min.

Die Probenvorbereitung bis zum Start einer Messserie von 21 Patientenproben und 3 Standards nahm unter koordiniertem Arbeiten etwa 4 Stunden in Anspruch. Am Vortag der Messung mussten zusätzlich noch folgende Arbeiten erledigt werden: Herstellen der verschiedenen Puffer, der Kaliumphosphatlösung, der mobilen Phase sowie die Prüfung der HPLC-Anlage und der anderen Geräte.

5.6. Berechnung der Aktivität der Thiopurin-S-Methyltransferase

Da die enzymatische Reaktion während der Inkubationszeit von einer Stunde abläuft und im Anschluss durch die Zugabe von Chloroform/2-Propanol gestoppt wurde, bezieht sich der gemessene 6-MTG-Spiegel auf eine Stunde. Die Menge des Enzyms im Lysat korreliert mit dem gemessenen Hämoglobinwert im Lysat, so dass die gemessene 6-MTG-Konzentration ebenfalls zum Hb-Wert des Lysates gesetzt werden muss (Kroplin et al., 1998). Daraus ergibt sich folgende Berechnung der Aktivität:

$$\text{TPMT-Aktivität} = c * (\text{Hb} * 1\text{h})^{-1} \quad \begin{array}{l} [c] = \text{nmol 6-MTG/100ml Lysat} \\ [\text{Hb}] = \text{g/100ml Lysat} \end{array}$$

wobei 1 nmol 6-MTG / g Hb * h einer Einheit der Enzymaktivität entspricht.

Beispiel: $c = 246,894 \text{ nmol 6-MTG/100ml Lysat}$
 $\text{Hb} = 5,2 \text{ g/100ml Lysat}$

$$\text{TPMT - Aktivität} = \frac{246,894}{5,2} * \frac{\text{nmol 6 - MTG}}{\text{g Hb} * \text{h}}$$

Für die Leukämiezellen und Knochenmarkszellen ergibt sich bei Bezug auf die gemessene Zellzahl die TPMT-Aktivität als

$$\text{TPMT-Aktivität} = c * (\text{Zellzahl} * 1\text{h})^{-1} \quad \begin{array}{l} [c] = \text{nmol 6-MTG/100ml Lysat} \\ [\text{Zellzahl}] = 10^9 \text{ Zellen/100ml Lysat} \end{array}$$

5.7. Angewandte statistische Methoden

Zur Erfassung der Daten wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Office Excel benutzt. Die statistische Aufarbeitung erfolgte nach Import der Daten aus Microsoft Office Excel mit SPSS for Windows und nach Timischl (Timischl, 2000). Als statistische Test wurden mit SPSS der t-Test für gepaarte Stichproben, der t-Test für ungepaarte Stichproben sowie der Levene-Test der Varianzgleichheit durchgeführt.

6. Ergebnisse

6.1. Etablierung der Methode

Zur Etablierung der Methode wurde die TPMT-Enzymaktivität aus Probandenblut bestimmt, das verschieden lange und bei unterschiedlichen Temperaturen gelagert wurde.

6.1.1. Wiederfindungsrate

Um die Lagerungsmöglichkeit zu überprüfen wurde Vollblut von den Probanden nach 4.1.1. direkt nach Abnahme weiterverarbeitet zu RBC-Lysaten und bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Enzymaktivität der RBC-Lysate wurden nach 1, 8, 13 und 15 Tagen sowie nach 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 und 12 Monaten bestimmt. In der Abb. 6.1. ist der Mittelwert aller 10 Probanden und der Schwankungsbereich der Einzelwerte gegen die Zeit aufgetragen.

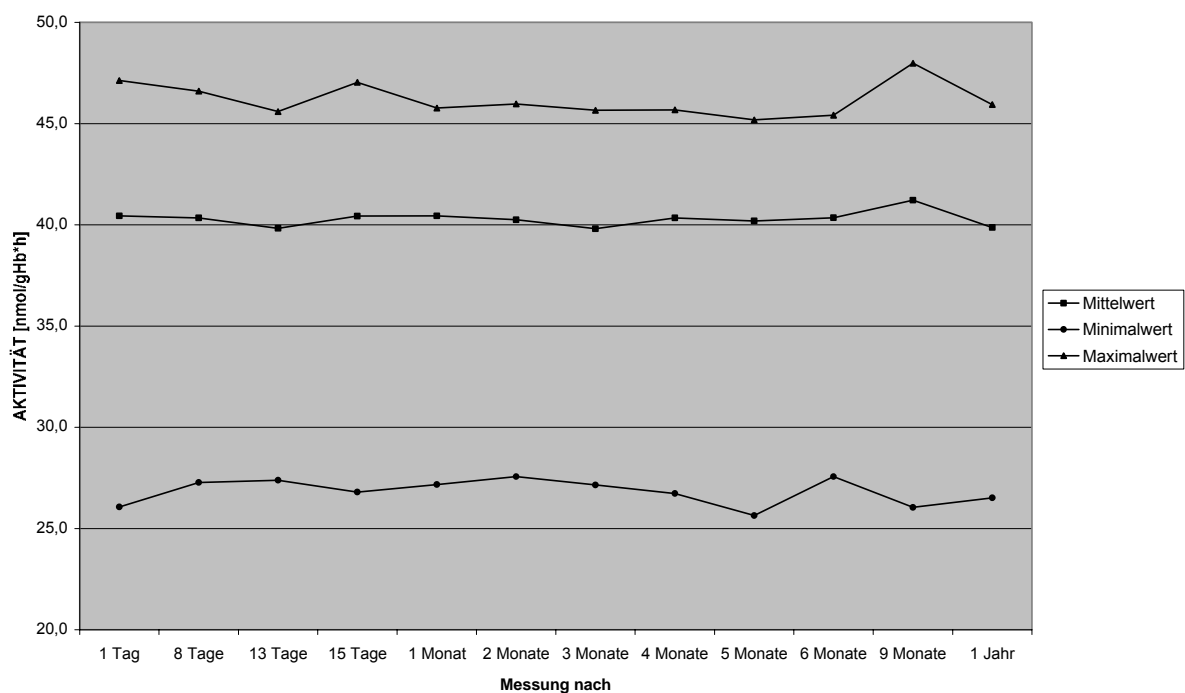


Abb. 6.1. Darstellung der TPMT-Aktivität als Mittelwert in Abhängigkeit zur Zeit (x-Achse: Zeitpunkt der Messung; y-Achse: Aktivität in nmol/gHb*h)

Die statistische Aufarbeitung mit einem α -Fehler von 5% ergab unter der Hypothese H_0 : „Die in den Paarungen verglichenen Mittelwerte sind gleich“ für alle Werte eine Signifikanz, die größer als der α -Fehler ist, so dass die Hypothese H_0 nicht abgelehnt werden konnte (Tab. 6.1.).

Paarung	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig (2-seitig)
	Mittelwert	SD	SF	95% Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
Paar 1: 1 Tag - 8 Tage	0,103	1,864	0,590	-1,230	1,437	0,175	9	0,865
Paar 2: 1 Tag - 13 Tage	0,609	1,836	0,581	-0,704	1,923	1,050	9	0,321
Paar 3: 1 Tag - 15 Tage	0,010	1,290	0,408	-0,913	0,933	0,025	9	0,980
Paar 4: 1 Tag - 1 Monat	0,002	1,380	0,436	-0,985	0,989	0,005	9	0,996
Paar 5: 1 Tag - 2 Monate	0,187	1,320	0,418	-0,757	1,132	0,448	9	0,665
Paar 6: 1 Tag - 3 Monate	0,630	1,531	0,484	-0,465	1,725	1,302	9	0,225
Paar 7: 1 Tag - 4 Monate	0,097	1,364	0,431	-0,879	1,073	0,224	9	0,828
Paar 8: 1 Tag - 5 Monate	0,248	1,256	0,397	-0,650	1,147	0,625	9	0,547
Paar 9: 1 Tag - 6 Monate	0,084	1,274	0,403	-0,828	0,996	0,208	9	0,840
Paar 10: 1 Tag - 9 Monate	-0,778	1,901	0,601	-2,138	0,582	-1,293	9	0,228
Paar 11: 1 Tag - 1 Jahr	0,569	1,098	0,347	-0,217	1,354	1,638	9	0,136

Tab. 6.1. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben (**Paarung**: Wertepaarung, die durch t-Test für gepaarte Stichproben verglichen wurden; **Gepaarte Differenzen**: **Mittelwert**: Mittelwert der Differenzen; **SD**: Standardabweichung der Differenzen; **SF**: Standardfehler des Mittelwertes der Differenzen; **95% Konfidenzintervall der Differenzen**: Vertrauensintervall auf festgelegtem Niveau ($\alpha=5\%$) für den Mittelwert der Differenz; **Untere**: untere Grenze; **Obere**: obere Grenze; **T**: t-Wert; **df**: Freiheitsgrade; **Sig (2-seitig)**: Signifikanzwert - Wahrscheinlichkeit für beobachteten oder noch größeren Mittelwert unter der Annahme von H_0 in der Grundgesamtheit (α -Fehler))

Die Äquivalenzprüfung der Gleichheit der Mittelwerte nach dem Westlake-Verfahren unter der Definition der Gleichheit bei nicht Abweichen von mehr als 5% des Mittelwertes nach einem Tag (40,44 nmol/gHb*h) mit dem resultierenden Toleranzintervall von (-2,022, +2,022) für das $(1 - 2\alpha)$ -Konfidenzintervall (=90%-Konfidenzintervall) ergab, dass alle 90%-Konfidenzintervalle im Toleranzintervall liegen und somit statistisch von Gleichheit der Mittelwerte gesprochen werden kann (Tab. 6.2.).

Damit ist gezeigt, dass die Aktivität im Rahmen statistischer Fluktuationen über 12 Monate signifikant konstant bleibt.

Paarung	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig (2-seitig)
	Mittel- wert	SD	SF	90% Konfidenzinter- vall der Differenz				
				Untere	Obere			
Paar 1: 1 Tag - 8 Tage	0,103	1,864	0,590	-0,977	1,184	0,175	9	0,865
Paar 2: 1 Tag - 13 Tage	0,609	1,836	0,581	-0,455	1,674	1,050	9	0,321
Paar 3: 1 Tag - 15 Tage	0,010	1,290	0,408	-0,738	0,758	0,025	9	0,980
Paar 4: 1 Tag - 1 Monat	0,002	1,380	0,436	-0,798	0,802	0,005	9	0,996
Paar 5: 1 Tag - 2 Monate	0,187	1,320	0,418	-0,578	0,953	0,448	9	0,665
Paar 6: 1 Tag - 3 Monate	0,630	1,531	0,484	-0,257	1,517	1,302	9	0,225
Paar 7: 1 Tag - 4 Monate	0,097	1,364	0,431	-0,694	0,888	0,224	9	0,828
Paar 8: 1 Tag - 5 Monate	0,248	1,256	0,397	-0,480	0,977	0,625	9	0,547
Paar 9: 1 Tag - 6 Monate	0,084	1,274	0,403	-0,655	0,823	0,208	9	0,840
Paar 10: 1 Tag - 9 Monate	-0,778	1,901	0,601	-1,880	0,324	-1,293	9	0,228
Paar 11: 1 Tag - 1 Jahr	0,569	1,098	0,347	-0,068	1,205	1,638	9	0,136

Tab. 6.2. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben zur Äquivalenzprüfung (**Paarung**: Wertepaarung, die durch t-Test für gepaarte Stichproben verglichen wurden; **Gepaarte Differenzen**: **Mittelwert**: Mittelwert der Differenzen; **SD**: Standardabweichung der Differenzen; **SF**: Standardfehler des Mittelwertes der Differenzen; **90% Konfidenzintervall der Differenzen**: Vertrauensintervall auf festgelegtem Niveau ($2\alpha=10\%$) für den Mittelwert der Differenz; **Untere**: untere Grenze; **Obere**: obere Grenze; **T**: t-Wert; **df**: Freiheitsgrade; **Sig (2-seitig)**: Signifikanzwert)

6.1.2. Vergleich der Aktivität bei verschiedener Lagerungszeit des Vollblutes

Zur Klärung, ob die Enzymaktivität im Vollblut im Kühlschrank bei +5°C konstant bleibt, wurde von sieben Probanden aus 4.1.2. Vollblut sofort, ein Tag und zwei Tage nach Lagerung bei +5°C zu RBC-Lysat verarbeitet und anschließend in einer Messserie bestimmt. Um längere Lagerungszeiten bei +5°C zu evaluieren, wurde in einem zweiten Ansatz von 10 Probanden Vollblut sofort und nach 5, 7, 12 und 14 Tagen bei Lagerung bei +5°C zu RBC-Lysat verarbeitet, direkt bei -30°C eingefroren und am Folgetag gemessen. Hierbei ergaben sich folgende Ergebnisse: Die Tab. 6.3. zeigt die Messergebnisse der sieben Probanden (Nr. 1-7) mit der dazugehörigen Statistik in Tab. 6.4. und Tab. 6.5. mit einem 5%-Toleranzintervall von (-2,544, +2,544), die Messergebnisse der zehn anderen Probanden (Nr. 8-17) sowie die dazugehörige Statistik in Tab. 6.6., Tab. 6.7. und Tab. 6.8. mit einem 5%-Toleranzintervall von (-2,022, +2,022). Die Werte haben sich über den gemessenen Zeitraum statistisch signifikant als konstant gezeigt (siehe hierzu vergleichend die Erläuterung zur Statistik aus 6.1.1.).

Nr	Aktivität Sofort	Aktivität nach 1 Tag	Aktivität nach 2 Tagen
1	44,822	45,315	44,037
2	46,906	47,353	47,104
3	50,411	51,662	50,562
4	68,392	68,488	67,389
5	47,850	47,477	48,550
6	47,375	47,082	47,456
7	50,403	49,476	50,382
Ø	50,880	50,979	50,783

Tab. 6.3. Vergleich der Aktivität bei verschiedener Lagerungszeit des Vollblutes über 2 Tage (Nr: Probandennummer; **Aktivität Sofort:** Aktivität in nmol/gHb*h am Tage der Blutentnahme; **Aktivität nach 1 Tag:** Aktivität in nmol/gHb*h 1 Tag nach der Blutentnahme; **Aktivität nach 2 Tagen:** Aktivität in nmol/gHb*h 2 Tage nach der Blutentnahme)

Paarung	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig (2-seitig)
	Mittelwert	SD	SF	95% Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
Paar 1: Sofort - 1 Tag	-0,099	0,711	0,269	-0,757	0,558	-0,369	6	0,725
Paar 2: Sofort - 2 Tage	0,097	0,594	0,224	-0,452	0,646	0,432	6	0,681

Tab. 6.4. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben (**Paarung:** Wertepaarung, die durch t-Test für gepaarte Stichproben verglichen wurden; **Gepaarte Differenzen:** **Mittelwert:** Mittelwert der Differenzen; **SD:** Standardabweichung der Differenzen; **SF:** Standardfehler des Mittelwertes der Differenzen; **95% Konfidenzintervall der Differenzen:** Vertrauensintervall auf festgelegtem Niveau ($\alpha=5\%$) für den Mittelwert der Differenz; **Untere:** untere Grenze; **Obere:** obere Grenze; **T:** t-Wert; **df:** Freiheitsgrade; **Sig (2-seitig):** Signifikanzwert - Wahrscheinlichkeit für beobachteten oder noch größeren Mittelwert unter der Annahme von H_0 in der Grundgesamtheit (α -Fehler))

Paarung		Gepaarte Differenzen					T	df	Sig (2-seitig)
		Mittelwert	SD	SF	90% Konfidenzintervall der Differenz				
					Untere	Obere			
Paar 1:	Sofort - 1 Tag	-0,099	0,711	0,269	-0,621	0,423	-0,369	6	0,725
Paar 2:	Sofort - 2 Tage	0,097	0,594	0,224	-0,339	0,533	0,432	6	0,681

Tab. 6.5. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben zur Äquivalenzprüfung (**Paarung:** Wertepaarung, die durch t-Test für gepaarte Stichproben verglichen wurden; **Gepaarte Differenzen:** **Mittelwert:** Mittelwert der Differenzen; **SD:** Standardabweichung der Differenzen; **SF:** Standardfehler des Mittelwertes der Differenzen; **90% Konfidenzintervall der Differenzen:** Vertrauensintervall auf festgelegtem Niveau ($2\alpha=10\%$) für den Mittelwert der Differenz; **Untere:** untere Grenze; **Obere:** obere Grenze; **T:** t-Wert; **df:** Freiheitsgrade; **Sig (2-seitig):** Signifikanzwert)

Nr	Aktivität Sofort	Aktivität nach 5 Tagen	Aktivität nach 7 Tagen	Aktivität nach 12 Tagen	Aktivität nach 14 Tagen
8	26,709	26,534	27,166	27,550	28,316
9	46,223	45,934	45,876	46,619	50,017
10	26,067	28,485	28,954	27,869	28,750
11	40,977	39,320	41,290	41,587	41,751
12	41,857	40,752	42,235	42,531	42,756
13	47,125	45,612	45,845	44,000	45,833
14	44,133	41,229	44,115	44,204	43,652
15	43,512	42,537	41,364	42,375	44,330
16	43,039	41,967	40,662	40,890	41,806
17	44,765	46,086	44,851	45,799	44,885
Ø	40,441	39,846	40,236	40,342	41,210

Tab. 6.6. Vergleich der Aktivität bei verschiedener Lagerungszeit des Vollblutes über 14 Tage (**Nr:** Probandennummer; **Aktivität Sofort:** Aktivität in nmol/gHb*h am Tage der Blutentnahme; **Aktivität nach 5 Tagen:** Aktivität in nmol/gHb*h 5 Tage nach der Blutentnahme; **Aktivität nach 7 Tagen:** Aktivität in nmol/gHb*h 7 Tage nach der Blutentnahme; **Aktivität nach 12 Tagen:** Aktivität in nmol/gHb*h 12 Tage nach der Blutentnahme; **Aktivität nach 14 Tagen:** Aktivität in nmol/gHb*h 14 Tage nach der Blutentnahme)

Paarung	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig (2-seitig)
	Mittel- wert	SD	SF	95% Konfidenzinter- vall der Differenz				
				Untere	Obere			
Paar 3: Sofort - 5 Tage	0,595	1,526	0,483	-0,496	1,687	1,233	9	0,249
Paar 4: Sofort - 7 Tage	0,205	1,505	0,476	-0,872	1,282	0,431	9	0,677
Paar 5: Sofort - 12 Tage	0,098	1,549	0,490	-1,010	1,206	0,201	9	0,845
Paar 6: Sofort - 14 Tage	-0,769	1,625	0,514	-1,932	0,394	-1,496	9	0,169

Tab. 6.7. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben (**Paarung:** Wertepaarung, die durch t-Test für gepaarte Stichproben verglichen wurden; **Gepaarte Differenzen:** **Mittelwert:** Mittelwert der Differenzen; **SD:** Standardabweichung der Differenzen; **SF:** Standardfehler des Mittelwertes der Differenzen; **95% Konfidenzintervall der Differenzen:** Vertrauensintervall auf festgelegtem Niveau ($\alpha=5\%$) für den Mittelwert der Differenz; **Untere:** untere Grenze; **Obere:** obere Grenze; **T:** t-Wert; **df:** Freiheitsgrade; **Sig (2-seitig):** Signifikanzwert - Wahrscheinlichkeit für beobachteten oder noch größeren Mittelwert unter der Annahme von H_0 in der Grundgesamtheit (α -Fehler))

	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig (2-seitig)
	Mittel- wert	SD	SF	90% Konfidenzinter- vall der Differenz				
				Untere	Obere			
Paar 3: Sofort - 5 Tage	0,595	1,526	0,483	-0,289	1,480	1,233	9	0,249
Paar 4: Sofort - 7 Tage	0,205	1,505	0,476	-0,668	1,078	0,431	9	0,677
Paar 5: Sofort - 12 Tage	0,098	1,549	0,490	-0,800	0,996	0,201	9	0,845
Paar 6: Sofort - 14 Tage	-0,769	1,625	0,514	-1,711	0,173	-1,496	9	0,169

Tab. 6.8. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben zur Äquivalenzprüfung (**Paarung**: Wertepaarung, die durch t-Test für gepaarte Stichproben verglichen wurden; **Gepaarte Differenzen**: **Mittelwert**: Mittelwert der Differenzen; **SD**: Standardabweichung der Differenzen; **SF**: Standardfehler des Mittelwertes der Differenzen; **90% Konfidenzintervall der Differenzen**: Vertrauensintervall auf festgelegtem Niveau ($2\alpha=10\%$) für den Mittelwert der Differenz; **Untere**: untere Grenze; **Obere**: obere Grenze; **T**: t-Wert; **df**: Freiheitsgrade; **Sig (2-seitig)**: Signifikanzwert)

6.1.3. Vergleich der Aktivität bei Lagerung bei -30°C und -80°C

Um die Auswirkung verschiedener Lagerungstemperaturen zu untersuchen, wurde von acht Probanden aus 4.1.3 Vollblut sofort zu RBC-Lysaten verarbeitet und einerseits bei -30°C und andererseits bei -80°C eingefroren. Eine Woche nach Verarbeitung wurde das RBC-Lysat, welches bei -30°C eingefroren war, und über einen Monat nach der Verarbeitung das RBC-Lysat, welches bei -30°C und -80°C eingefroren war, gemessen. Dabei ergaben sich die in Tab. 6.9. aufgeführten Ergebnisse.

Nr.	Aktivität direkt	Aktivität nach 30 Tagen bei -30°C	Aktivität nach 30 Tagen bei - 80°C
1	44,972	45,022	44,683
2	51,264	52,313	51,443
3	47,826	48,287	47,302
4	46,570	46,835	44,447
5	48,601	48,655	47,995
6	40,112	40,843	41,283
7	26,808	25,613	26,014
8	39,629	39,189	40,840
Ø	43,223	43,344	43,001

Tab. 6.9. Vergleich der Aktivität bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (-30°C und -80°C) (**Nr**: Probandennummer; **Aktivität direkt**: Aktivität in nmol/gHb*h am Tage der RBC-Lysatherstellung; **Aktivität nach 30 Tagen bei -30°C**: Aktivität in nmol/gHb*h 30 Tage nach RBC-Lysatherstellung und RBC-Lysatlagerung bei -30°C; **Aktivität nach 30 Tagen bei -80°C**: Aktivität in nmol/gHb*h 30 Tage nach RBC-Lysatherstellung und RBC-Lysatlagerung bei -80°C)

Die statistische Analyse der Werte mit dem t-Test für gepaarte Stichproben und die Äquivalenzprüfung nach dem Westlake-Verfahren mit einem 5%-Toleranzintervall von (-2,161, +2,161) für Paar 1 und 2 bzw. (-2,150, +2,150) für Paar 3 ergab die Gleichheit der Werte, so dass man statistisch signifikant von der Gleichheit beider Lagerungsformen sprechen kann (Tab. 6.10., Tab. 6.11., siehe vergleichend die Erläuterungen zur Statistik in 6.1.1.).

Paarung	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig (2-seitig)
	Mittelwert	SD	SF	95% Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
Paar 1: Akt. direkt - Akt. n. 30d bei -30°C	-0,122	0,700	0,247	-0,707	0,463	-0,493	7	0,637
Paar 2: Akt. direkt - Akt. n. 30d bei -80°C	0,222	1,091	0,386	-0,691	1,134	0,575	7	0,583
Paar 3: Akt. n. 30d bei -30°C - Akt. n. 30d bei -80°C	0,344	1,202	0,425	-0,661	1,349	0,809	7	0,445

Tab. 6.10. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben (**Paarung**: Wertepaarung, die durch t-Test für gepaarte Stichproben verglichen wurden; **Gepaarte Differenzen**: **Mittelwert**: Mittelwert der Differenzen; **SD**: Standardabweichung der Differenzen; **SF**: Standardfehler des Mittelwertes der Differenzen; **95% Konfidenzintervall der Differenzen**: Vertrauensintervall auf festgelegtem Niveau ($\alpha=5\%$) für den Mittelwert der Differenz; **Untere**: untere Grenze; **Obere**: obere Grenze; **T**: t-Wert; **df**: Freiheitsgrade; **Sig (2-seitig)**: Signifikanzwert - Wahrscheinlichkeit für beobachteten oder noch größeren Mittelwert unter der Annahme von H_0 in der Grundgesamtheit (α -Fehler))

Paarung	Gepaarte Differenzen					T	df	Sig (2-seitig)
	Mittelwert	SD	SF	90% Konfidenzintervall der Differenz				
				Untere	Obere			
Paar 1: Akt. direkt - Akt. n. 30d bei -30°C	-0,122	0,700	0,247	-0,590	0,347	-0,493	7	0,637
Paar 2: Akt. direkt - Akt. n. 30d bei -80°C	0,222	1,091	0,386	-0,509	0,953	0,575	7	0,583
Paar 3: Akt. n. 30d bei -30°C - Akt. n. 30d bei -80°C	0,344	1,202	0,425	-0,461	1,149	0,809	7	0,445

Tab. 6.11. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben zur Äquivalenzprüfung (**Paarung**: Wertepaarung, die durch t-Test für gepaarte Stichproben verglichen wurden; **Gepaarte Differenzen**: **Mittelwert**: Mittelwert der Differenzen; **SD**: Standardabweichung der Differenzen; **SF**: Standardfehler des Mittelwertes der Differenzen; **90% Konfidenzintervall der Differenzen**: Vertrauensintervall auf festgelegtem Niveau ($2\alpha=10\%$) für den Mittelwert der Differenz; **Untere**: untere Grenze; **Obere**: obere Grenze; **T**: t-Wert; **df**: Freiheitsgrade; **Sig (2-seitig)**: Signifikanzwert)

6.2. Referenzwerte im Lebensalter von 0 bis 18 Jahren

Die gemessene Enzymaktivität der 346 Probanden (201 männlich, 145 weiblich) als Referenzbänder aufgetragen sind im Folgenden dargestellt:

In der Abbildung 6.2. ist die Enzymaktivität aller 346 Probanden zum Alter in Jahresabständen aufgetragen. Der Mittelwert betrug 46,20 nmol/gHb*h und der Median 45,94 nmol/gHb*h.

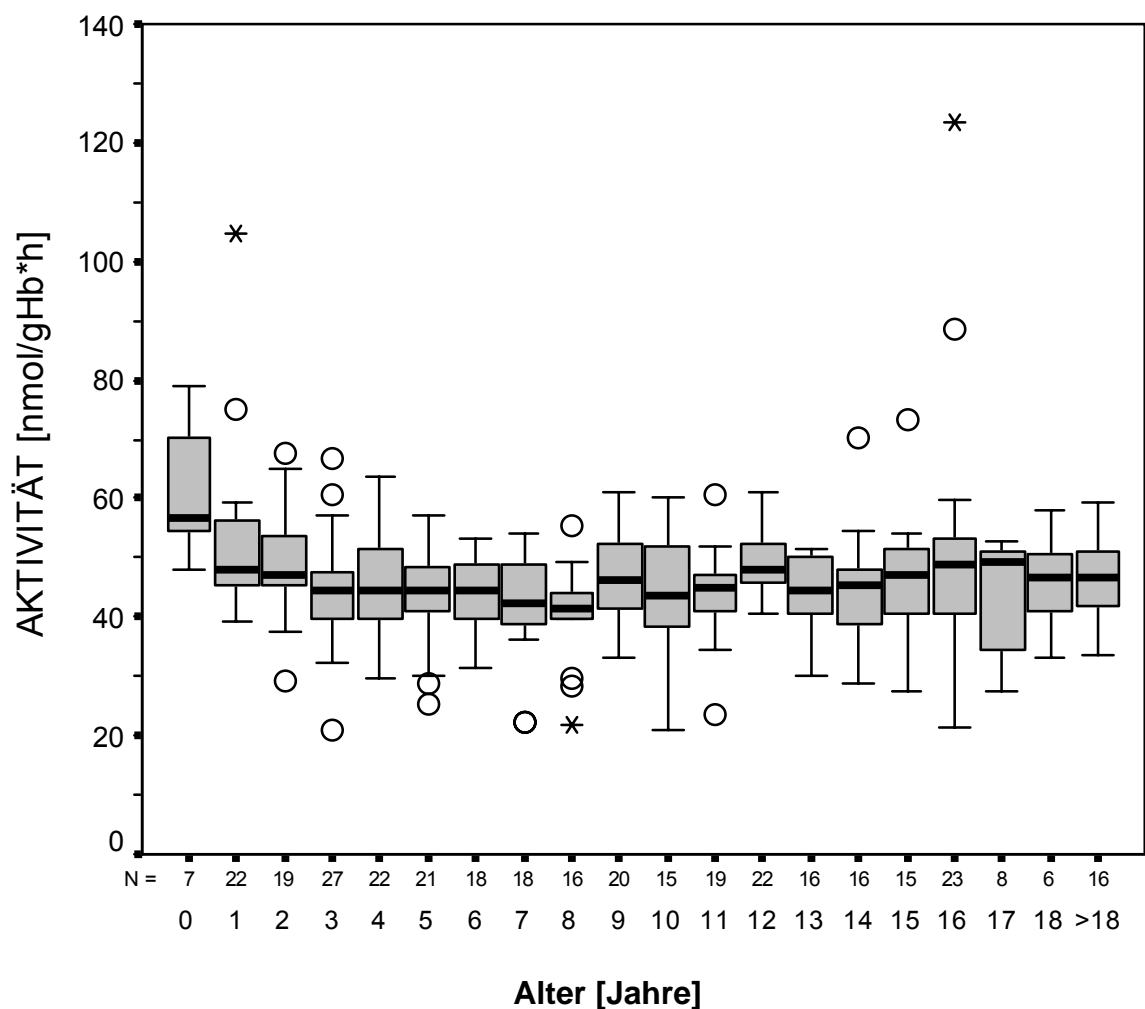


Abb. 6.2. Altersabhängigkeit der Aktivität (x-Achse: Alter in Jahren, y-Achse: Aktivität in nmol/gHb*h; N: Anzahl der Probanden pro Jahrgang; **Grauer Bereich:** Interquartilsabstand IQR (Bereich zwischen 1. Quartil Q_1 und 3. Quartil Q_3); **T:** Maximalwert ($= Q_3 + 1,5 \cdot IQR$); **L:** Minimalwert ($= Q_1 - 1,5 \cdot IQR$); **Stern:** Extremwert; **Kreis:** Ausreißer; **Median** (schwarzer Balken) und **Mittelwert:** Darstellung als Zahlenwert)

Die geschlechtsspezifische Darstellung der männlichen Probanden (n = 201) sind in Abb. 6.3., die der weiblichen Probanden (n = 145) in Abb. 6.4. dargestellt. Hier konnte kein geschlechtsspezifischer Unterschied weder in der Altersverteilung noch in der Höhe der Aktivität festgestellt werden. Der Mittelwert betrug bei den männlichen Probanden 46,34 nmol/gHb*h, der Median 46,03 nmol/gHb*h und bei den weiblichen Probanden lag der Mittelwert bei 46,02 nmol/gHb*h und der Median bei 45,67 nmol/gHb*h.

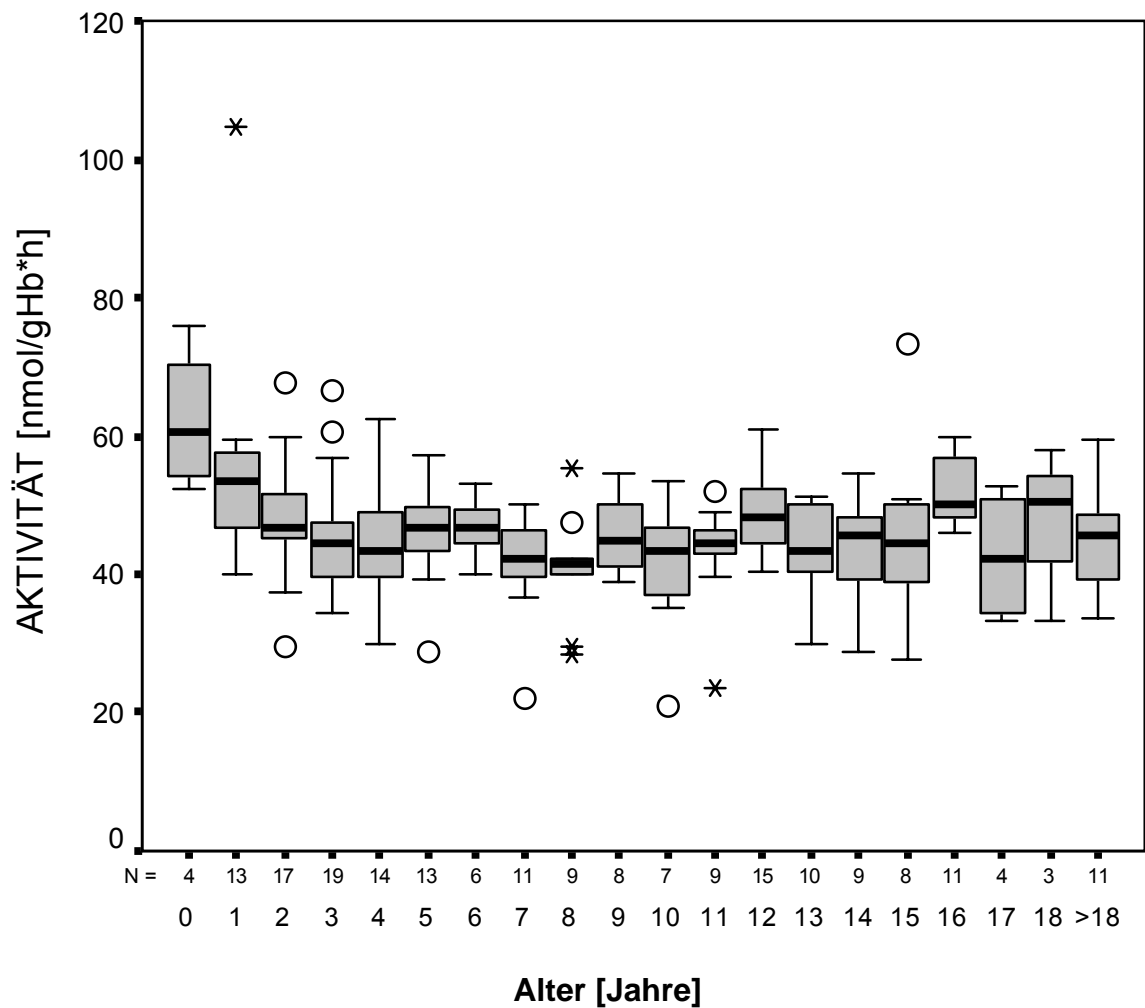
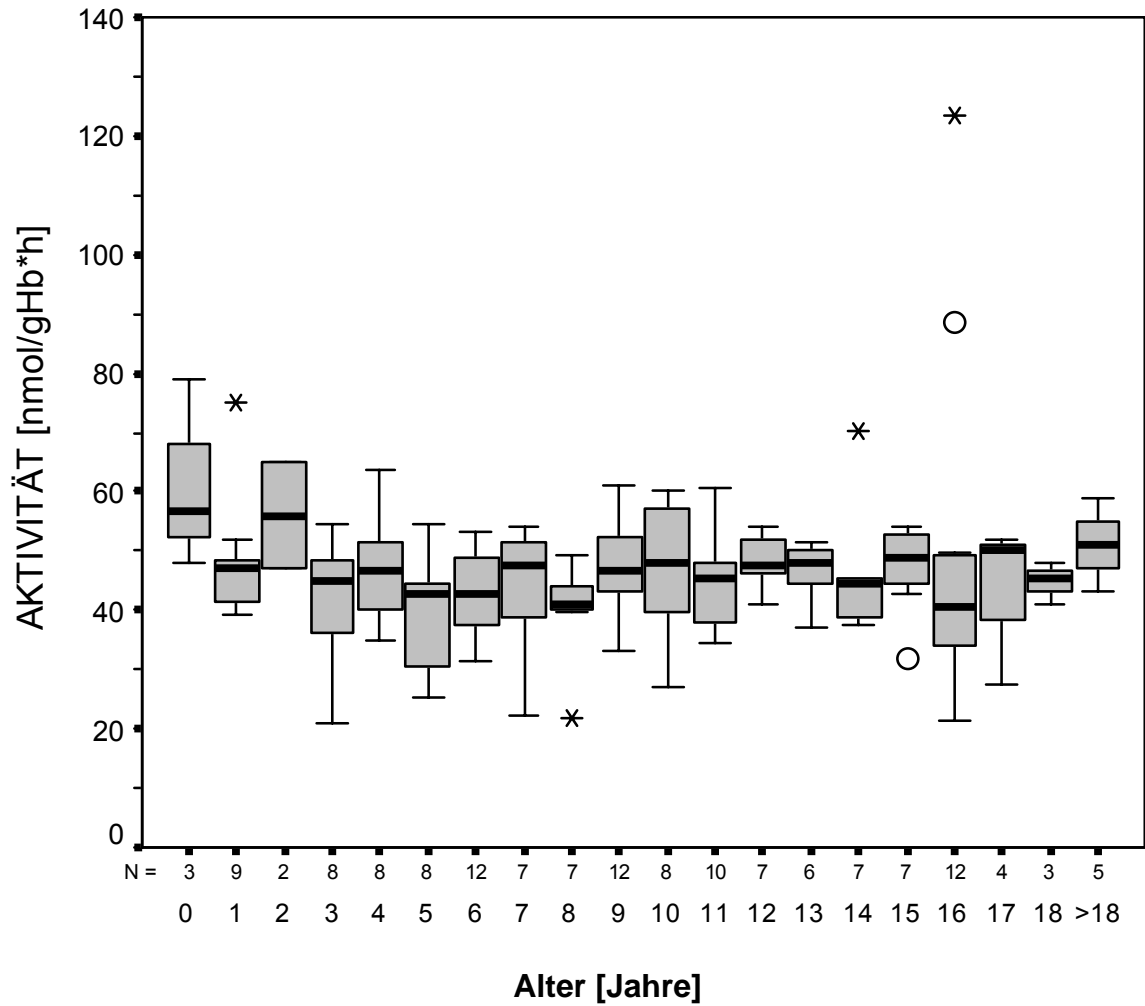


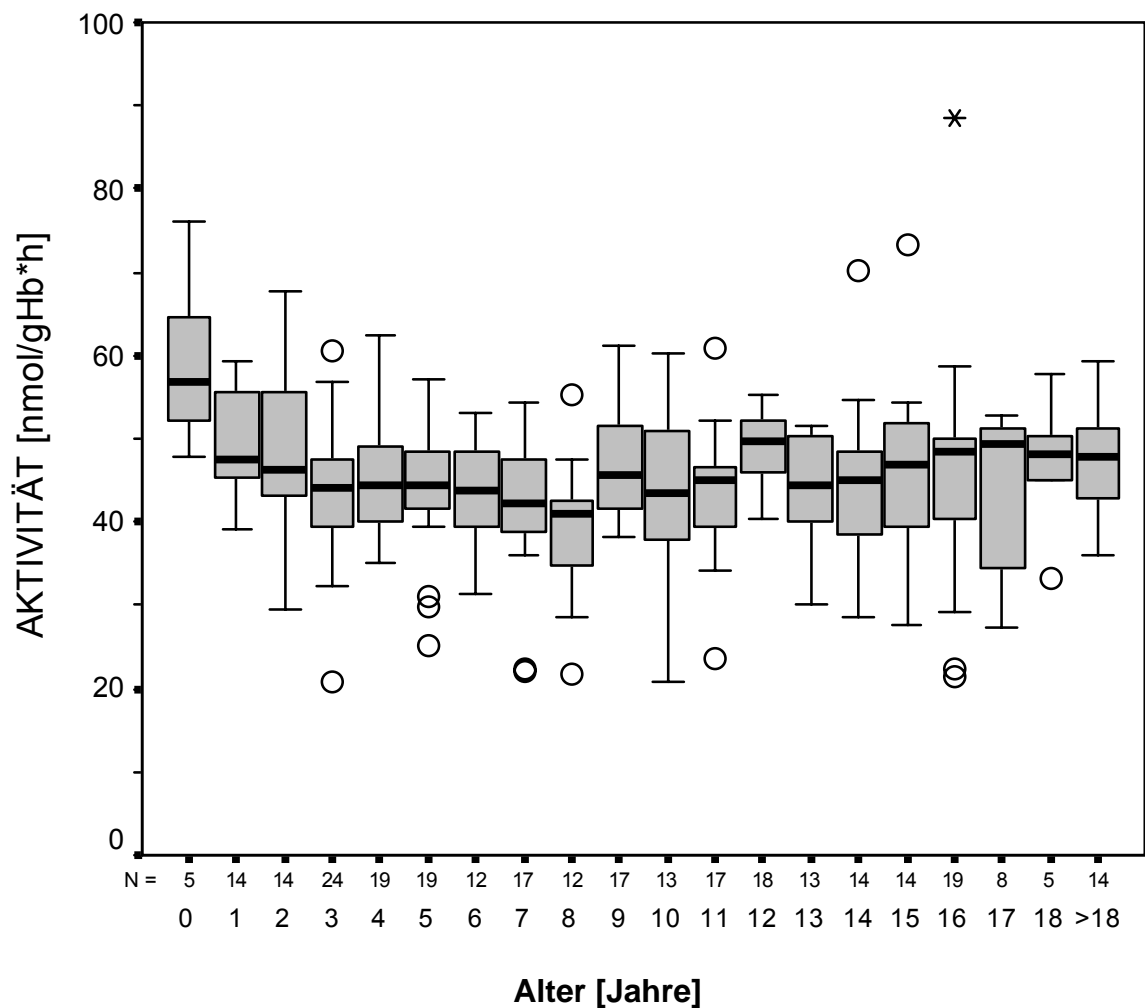
Abb. 6.3. Altersabhängigkeit der Aktivität von männlichen Probanden (**x-Achse**: Alter in Jahren, **y-Achse**: Aktivität in nmol/gHb*h; **N**: Anzahl der Probanden pro Jahrgang; **Grauer Bereich**: Interquartilsabstand IQR (Bereich zwischen 1. Quartil Q_1 und 3. Quartil Q_3); **T**: Maximalwert ($= Q_3 + 1,5 \cdot IQR$); **⊥**: Minimalwert ($= Q_1 - 1,5 \cdot IQR$); **Stern**: Extremwert; **Kreis**: Ausreißer; **Median** (schwarzer Balken) und **Mittelwert**: Darstellung als Zahlenwert)



Median	56,8	47,3	56,0	44,8	46,7	42,9	42,9	47,6	40,9	46,7	48,2	45,2	47,4	48,0	44,5	49,0	40,4	50,0	45,2	51,2
Mittelwert	61,2	48,1	56,0	41,8	46,9	39,5	42,9	43,6	40,0	47,3	47,1	44,7	48,3	46,5	45,9	47,0	49,3	44,8	44,8	51,0

Abb. 6.4. Altersabhängigkeit der Aktivität von weiblichen Probanden (**x-Achse**: Alter in Jahren, **y-Achse**: Aktivität in nmol/gHb*h; **N**: Anzahl der Probanden pro Jahrgang; **Grauer Bereich**: Interquartilsabstand IQR (Bereich zwischen 1. Quartil Q_1 und 3. Quartil Q_3); **┐**: Maximalwert ($= Q_3 + 1,5 \cdot IQR$); **└**: Minimalwert ($= Q_1 - 1,5 \cdot IQR$); **Stern**: Extremwert; **Kreis**: Ausreißer; **Median** (schwarzer Balken) und **Mittelwert**: Darstellung als Zahlenwert)

Nach Herausnahme aller nicht-deutschen Probanden ergab sich eine Probandengruppe mit N=288 (168 männlich, 120 weiblich). In der Abb. 6.5. ist dieses Patientenkollektiv dargestellt. Auch hier fiel kein Unterschied im Vergleich zum Gesamtkollektiv auf bei einem Gesamtmittelwert von 45,33 nmol/gHb*h und einem Median von 45,77 nmol/gHb*h.



Median	56,8	47,5	46,4	44,0	44,5	44,5	43,8	42,2	40,9	45,7	43,3	45,1	49,7	44,4	45,0	46,8	48,5	49,4	48,1	47,8
Mittelwert	59,5	49,0	48,4	43,5	45,0	43,6	43,8	41,6	39,3	47,0	43,2	43,7	48,7	44,4	44,6	46,3	46,4	43,7	47,0	47,5

Abb. 6.5. Altersabhängigkeit der Aktivität von deutschen Probanden (**x-Achse:** Alter in Jahren, **y-Achse:** Aktivität in nmol/gHb*h; **N:** Anzahl der Probanden pro Jahrgang; **Grauer Bereich:** Interquartilsabstand IQR (Bereich zwischen 1. Quartil Q_1 und 3. Quartil Q_3); **┐:** Maximalwert ($= Q_3 + 1,5 \cdot IQR$); **┘:** Minimalwert ($= Q_1 - 1,5 \cdot IQR$); **Stern:** Extremwert; **Kreis:** Ausreißer; **Median** (schwarzer Balken) und **Mittelwert:** Darstellung als Zahlenwert)

Auffällig in allen vier Abbildungen (Abb. 6.2., Abb. 6.3., Abb. 6.4. und Abb. 6.5.) ist eine höhere Aktivität im ersten Lebensjahr. Die dazugehörigen Werte sind in Tab. 6.12. aufgeführt.

Nr	Probandenkollektiv	Mittelwert der Probanden im Alter < 1 Jahr		Mittelwert der Probanden im Alter ≥ 1 Jahr	
		Aktivität	N	Aktivität	N
1	Alle (Abb. 6.2.)	61,845	7	45,880	339
2	Männliche Probanden (Abb. 6.3.)	62,300	4	46,013	197
3	Weibliche Probanden (Abb. 6.4.)	61,239	3	45,695	142
4	Deutsche Probanden (Abb. 6.5.)	59,474	5	45,082	283

Tab. 6.12. Darstellung der Mittelwert der Aktivität für die verschiedenen Patientenkollektive (**Nr:** Kollektivnummer; **Probandenkollektiv:** zugehöriges Kollektiv; **Aktivität:** TPMT-Aktivität in nmol/gHb*h; **N:** Anzahl der Subgruppe)

Die statistische Analyse (Tab. 6.13.) dieser Werte durch den t-Test für unabhängige Stichproben zeigt nach Analyse mit dem Levene-Test die Varianzgleichheit bei einem α -Fehler von 5% und danach mit dem T-Test für die Mittelwertgleichheit den signifikanten Unterschied der Mittelwerte (siehe Tab. 6.13.: hervorgehobene Werte in Sig (2-seit)) bei Ablehnung der Hypothese H_0 : „Die Mittelwerte der Stichproben sind gleich.“.

Nr	Varianzen	Levene-Test		T-Test für die Mittelwertgleichheit						
		F	Sign.	T	df	Sig (2-seit)	MD	SF	95% Konfidenzintervall der Differenz	
									Untere	Obere
1	sind gleich	0,884	0,348	-4,01	344	<0,001	-15,97	3,98	-23,79	-8,14
	sind nicht gleich			-3,54	6,19	0,012	-15,97	4,51	-26,92	-5,01
2	sind gleich	0,202	0,653	-3,49	199	0,001	-16,29	4,66	-25,48	-7,09
	sind nicht gleich			-3,10	3,10	0,051	-16,29	5,26	-32,74	0,17
3	sind gleich	0,644	0,424	-2,23	143	0,027	-15,54	6,96	-29,30	-1,79
	sind nicht gleich			-1,67	2,05	0,234	-15,54	9,30	-54,68	23,59
4	sind gleich	0,545	0,461	-3,55	286	<0,001	-14,39	4,06	-22,38	-6,41
	sind nicht gleich			-2,89	4,09	0,043	-14,39	4,98	-28,10	-0,68

Tab. 6.13. statistische Auswertung des Mittelwertunterschiedes der Aktivität von Probanden im ersten Lebensjahr zum Rest des Kollektivs durch Korrelationen bei ungepaarten Stichproben (**Nr.**: Patientenkollektiv (**1**: Alle, **2**: männliche Probanden, **3**: weibliche Probanden, **4**: deutsche Probanden); **Varianzen**: mögliche Varianzgleichheit; **Levene-Test**: Test zur Entscheidung der Varianzgleichheit; **F**: Testfunktionswert; **Sign.**: Signifikanz des Levenetests; **T-Test für die Mittelwertgleichheit**: **T**: t-Wert; **df**: Freiheitsgrade; **Sig (2-seit)**: Signifikanzwert - Wahrscheinlichkeit für beobachteten oder noch größeren Mittelwert unter der Annahme von H_0 in der Grundgesamtheit (α -Fehler); **MD**: mittlere Differenz der Stichprobenmittelwerte; **SF**: Standardfehler des Mittelwertes der Differenzen ; **95% Konfidenzintervall der Differenzen**: Vertrauensintervall auf festgelegtem Niveau ($\alpha=5\%$) für den Mittelwert der Differenz ; **Untere**: untere Grenze; **Obere**: obere Grenze)

6.3. Aktivität in anderen Blutzellen

6.3.1. Aktivität in Knochenmarkszellen

Bei den zwei Probanden war jeweils eine Aktivität nachweisbar. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.14. sichtbar.

Nr.	Zellzahl	Konzentration	Aktivität
	(10^9 KM-Zellen/100ml)	(nmol/100ml)	(nmol/ 10^9 KM-Zellen*h)
1	29,231	165,676	5,668
2	9,876	61,700	6,248

Tab. 6.14. Ergebnisse der TPMT-Aktivitätsmessung aus Knochenmarkszellen (KM-Zellen) (**Nr.**: Patientennummer; **Zellzahl**: gemessene Zellzahl nach Isolierung; **Konzentration**: gemessener Wert; **Aktivität**: errechnete Aktivität aus den Messwerten)

6.3.2. Aktivität in Leukämiezellen

Auch in Leukämiezellen ließen sich TPMT-Aktivitäten messen. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.15. aufgeführt.

Nr.	Zellzahl	Konzentration	Aktivität
	(10^9 LM-Zellen/100ml)	(nmol/100ml)	(nmol/ 10^9 LM-Zellen*h)
1	29,226	961,158	32,887
2	9,967	62,654	6,286
3	5,200	51,704	9,943

Tab. 6.15. Ergebnisse der TPMT-Aktivitätsmessung aus Leukämiezellen (LM-Zellen) (**Nr.:** Patientennummer; **Zellzahl:** gemessene Zellzahl nach Isolierung; **Konzentration:** gemessener Wert; **Aktivität:** errechnete Aktivität aus den Messwerten)

6.3.3. Vergleich der Aktivität in Leukämiezellen und Knochenmarkszellen

Der Vergleich der Aktivität in Knochenmarkszellen und in Leukämiezellen zeigt einen identischen Wert (Tab. 6.16.). Der entsprechende Wert der TPMT-Aktivität aus den Erythrozyten betrug 20,935 nmol/gHb*h.

Zelltyp	Zellzahl	Konzentration	Aktivität
	(10^9 Zellen/100ml)	(nmol/100ml)	(nmol/ 10^9 Zellen*h)
KM-Zellen	9,876	61,7005	6,248
LM-Zellen	9,967	62,6541	6,286

Tab. 6.16. Vergleich der Aktivität in Leukämiezellen (LM-Zellen) und Knochenmarkszellen (KM-Zellen) (**Zelltyp:** Art der Zellen; **Zellzahl:** gemessene Zellzahl nach Isolierung; **Konzentration:** gemessener Wert; **Aktivität:** errechnete Aktivität aus den Messwerten)

7. Diskussion

Bei unterschiedlichen Erkrankungen wie zum Beispiel Lupus erythematosus, Myasthenia gravis, Morbus Crohn (Belaiche et al., 2001; Cara et al., 2004), Hauterkrankungen wie Pemphigus und atopisches Ekzem (Tan et al., 1997), akute myeloische Leukämien und akute lymphoblastische Leukämien (Hongeng et al., 2000) sowie bei Patienten nach Organtransplantation (Dervieux et al., 1999) werden Azathioprine, 6-Mercaptopurine und 6-Thioguanine therapeutisch eingesetzt. Diese stellen Antimetaboliten als Purinanaloga dar und stören so den Nucleinsäuremetabolismus. Azathioprin ist eine inaktive Substanz und wird im Körper in 6-Mercaptopurin umgewandelt. 6-Mercaptopurin wird im Körper durch drei verschiedene Stoffwechselwege in ihre aktive Form umgewandelt bzw. inaktiviert (Balis et al., 1999; Cara et al., 2004):

1. Oxidation zu 6-Thioharnsäure durch die Xanthinoxidase
2. Umwandlung zu 6-Thioinosinmonophosphat durch die Hypoxanthin-guaninphosphoribosyltransferase und weiter durch verschiedene weitere Enzyme zu 6-Thioguanin-Nucleotide
3. S-Methylation von Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioinosinmonophosphat und 6-Thioguanin durch die Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT)

Eine schematische Darstellung ist in Abb. 7.1. zu sehen (Cara et al., 2004).

Die therapeutische Wirkung der oben genannten Medikamente beruht auf dem Einbau der 6-Thioguaninnukleotide in die DNS und RNS (Elion, 1989; Lee et al., 2005; Nygaard et al., 2003; Tidd et al., 1974) und starken antimetabolischen Effekt der Inhibition der de-novo-Synthese von Purin durch 6-Methyl-Thioinosinmonophosphat (Cara et al., 2004). Die in der Klinik beobachteten Fälle der Myelosuppression bei Behandlung mit den oben genannten Medikamenten sind durch die intrazelluläre Akkumulation von 6-Thioguanin-Nucleotide zu erklären (Lennard et al., 1987). Aus klinischen Untersuchungen ist die Akkumulation der 6-Thioguanin-Nucleotide umgekehrt abhängig zur Aktivität der TPMT, da diese den entscheidenden Eliminationsweg für die oben genannten Medikamente darstellt (Lennard et al., 1987; Schutz et al., 1996). In einer Häufigkeit von 1 zu 300 ist mit dem Auftreten eines genetisch bedingten TPMT-Defizits zu rechnen (Carroll et al., 2003; Lennard et al., 1989). Dies führt zur schnellen Akkumulation von 6-Thioguanin-Nukleotiden mit der Gefahr einer

Myelosuppression (Evans, 2004; Schaeffeler et al., 2001). Diese pharmakogenetisch bedingte Ursache einer erhöhten Toxizität der oben genannten Medikamente lässt sich durch Kenntnis der TPMT-Aktivität über eine reduzierte Medikamentendosis minimieren oder verhindern. Hieraus ergibt sich die klinische Notwendigkeit der Messbarkeit der TPMT-Aktivität.

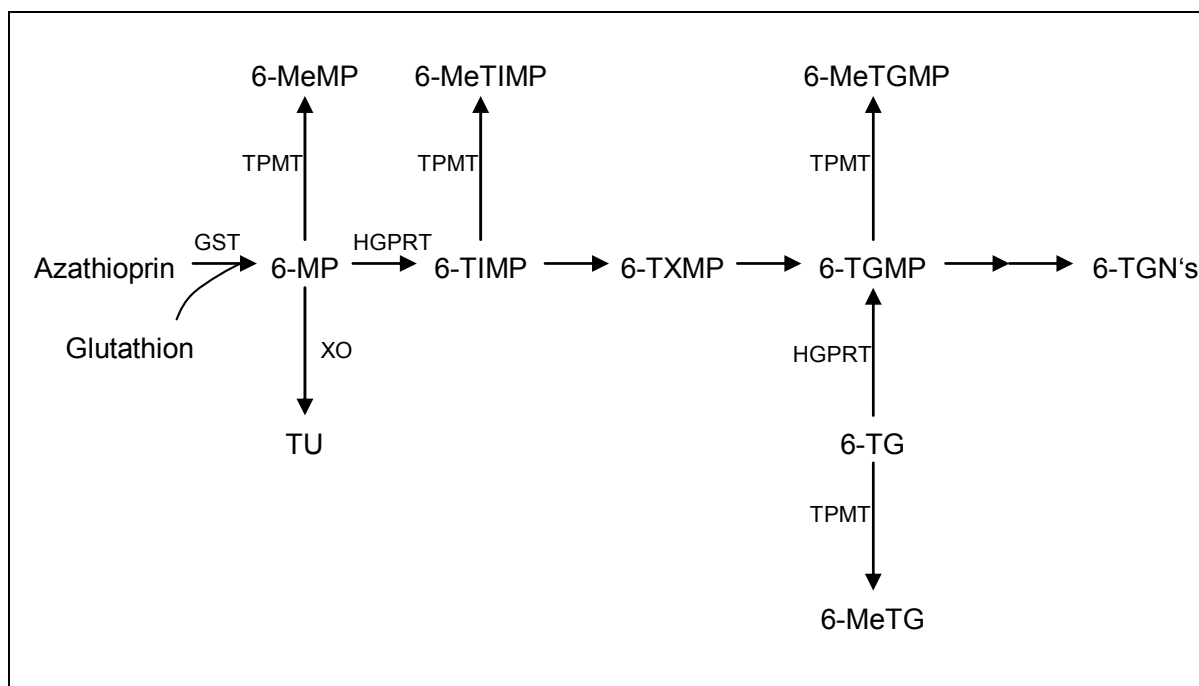


Abb. 7.1. Schematische Darstellung des Stoffwechsel von Azathioprin, 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin (**GST**: Glutathion-S-Transferase, **6-MP**: 6-Mercaptopurin, **TPMT**: Thiopurin-S-Methyltransferase, **6-MeMP**: 6-Methylmercaptapurin, **XO**: Xanthinoxidase, **TU**: Thioharnsäure, **HGPRT**: Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase, **6-TIMP**: 6-Thioinosinmonophosphat, **6-MeTIMP**: 6-Methylthioinosinmonophosphat, **6-TXMP**: 6-Thioxanthinmonophosphat, **6-TGMP**: 6-Thioguaninmonophosphat, **6-MeTGMP**: 6-Methylthioguaninmonophosphat, **6-TGN's**: 6-Thioguaninnukleotide, **6-TG**: 6-Thioguanin, **6-MeTG**: 6-Methylthioguanin) (aus (Cara et al., 2004))

In der Literatur sind zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der TPMT Aktivität beschrieben:

1. Radiochemisches Microassay nach Weinshilboum (Weinshilboum et al., 1978)
2. Chromatographisches Assay nach Lennard (Lennard et al., 1994) und Modifikation.

In dieser Arbeit wurde die chromatographische Methode aufgegriffen und Untersuchungen zur Methodenetablierung und Messung von Referenzwerten vom Kindes- und Jugendalter bis ins Erwachsenenalter durchgeführt.

7.1. Etablierung der Methode

Die Ergebnisse der Etablierung der Methode finden sich im Ergebnisteil unter 6.1..

7.1.1. Wiederfindungsrate

Bezüglich der Wiederfindungsrate konnte gezeigt werden, dass die TPMT-Aktivität in den RBC-Lysaten über einen Zeitraum von einem Jahr bei -30°C stabil bleibt. Für die auf 6-TG als Substrat basierte Methode wird dies durch die Ergebnisse von Kröplin bestätigt, der ebenfalls eine stabile Aktivität über Lagerungszeiten von Monaten bei -30°C findet (Kröplin et al., 1998). Die in der Literatur sonst beschriebenen Daten beziehen sich zum Grossteil auf die Methode, bei der 6-MP als Substrat benutzt wird. Für die Lagerung der Lysate ist dies jedoch nicht von Bedeutung, da die enzymatische Reaktion ja erst nach der Lagerung am Tag der Messung gestartet wird. Hier wurden ähnliche Ergebnisse gefunden bei einer Lagerung zwischen -70°C und -80°C (siehe auch 7.1.3.). Die Messungen in dieser Arbeit wurden erst 24 Stunden nach Vollblutverarbeitungen zu RBC-Lysaten durchgeführt. Ein Aktivitätsverlust in den ersten 24 Stunden ist jedoch von Lennard widerlegt worden. Lennard konnte bei Messung am Tage der Verarbeitung und 1 Tag nach Verarbeitung und Lagerung bei -80°C keine signifikante Aktivitätsänderung feststellen (Lennard et al., 1994). Die Lagerung der Lysate bei Raumtemperatur führt laut Kröplin nach 24 Stunden jedoch zu einer Aktivitätsminderung (Kröplin et al., 1998), während Garniere-Monteil 1999 unter gleichen Bedingungen eine Stabilität über 32 Stunden nachwies (Garniere-Monteil et al., 1999).

7.1.2. Vergleich der Aktivität bei verschiedener Lagerungszeit des Vollblutes

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die TPMT-Aktivität im Vollblut bei Lagerung bei $+5^{\circ}\text{C}$ über einen Zeitraum von 14 Tagen stabil bleibt. Dies würde den gekühlten Transport per Post innerhalb von 14 Tagen ermöglichen. Klemetsdal konnte 1992 die Stabilität der TPMT-Aktivität bei Postversand bei durchschnittlich $+18,9^{\circ}\text{C}$ innerhalb von 24 Stunden zeigen (Klemetsdal et al., 1992). Kröplin untersuchte ebenfalls die Aktivitätsänderung bei Raumtemperatur und bei $+4^{\circ}\text{C}$. Er konnte für einen Zeitraum von 6 Tagen stabile Messwerte darstellen (Kröplin et al., 1998). Widersprüchlich sind jedoch die Ergebnisse von Lennard. Sie zeigte zunächst die Stabilität bei Lagerung bei Raumtemperatur und bei $+4^{\circ}\text{C}$ (Lennard et al., 1994), später jedoch das Abfallen der Aktivität bei Messung am

6. Tag nach Lagerung bei Raumtemperatur (Lennard et al., 2001). Außerdem untersuchte sie die Stabilität bei Posttransport über einen Tag mit dem Ergebnis der Stabilität der Werte.

7.1.3. Vergleich der Aktivität bei Lagerung bei -30 °C und -80 °C

Es konnte kein statisch signifikanter Unterschied der TPMT-Aktivität bei Lagerung bei -80°C gegenüber -30°C festgestellt werden. Der Vergleich der Lagerung bei diesen Temperaturen ist in der Literatur nicht beschrieben. Klemetsdal beschreibt eine stabile TPMT-Aktivität bei Lagerung bei -80°C über eine Zeit von 18 Monate (Klemetsdal et al., 1992). Diese Beobachtung wird von Jacqz-Aigrain sowie von Alves bestätigt (Alves et al., 2001; Jacqz-Aigrain et al., 1994). Park-Hah beschreibt bei einer Lagerungstemperatur von -70°C ebenfalls stabile Aktivitätsniveaus (Park-Hah et al., 1996). Unter Hinzunahme der Literatur aus 7.1.1. ist die Konstanz der Aktivitätswerte bei beiden Lagerungstemperaturen gegeben.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Methode geeignet ist, Blutproben aus überregionalen Kliniken zu untersuchen. Vollblutproben können sogar bei Raumtemperatur versandt werden. Der Versand von Vollblutproben mittels Kühlbox ist bei längeren Transportzeiten notwendig. Der Versand von RBC-Lysaten erfordert allerdings eine Lagerung auf Trockeneis für den Transport. Hierunter verändert sich die Aktivität in den RBC-Lysaten ebenfalls nicht. -80°C müssen dabei nicht erreicht werden, -30°C sind ausreichend.

7.2. Referenzwerte im Lebensalter von 0 bis 18 Jahren

Die Bestimmung der Referenzwerte zeigt in dieser Arbeit keinen signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschied (Mittelwert aller Probanden 46,20 nmol/gHb*h, der weiblichen Probanden 46,02 nmol/gHb*h und der männlichen Probanden 46,34 nmol/gHb*h). Ebenso ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen unterschiedlichen ethnischen Gruppen nachweisen. Die deutschen Probanden zeigten mit einem Mittelwert von 45,33 nmol/gHb*h keine Abweichung vom Gesamtkollektiv mit vorwiegend türkischen Probanden. Bei den Referenzbändern fällt eine signifikant höhere Aktivität der unter Einjährigen gegenüber dem Restkollektiv auf. Ab dem zweiten Lebensjahr besteht kein statistischer Unterschied in der Aktivität der TPMT zu Erwachsenen. Auch in unterschiedlichen Altersgruppen findet sich keine geschlechtsspezifische Abweichung.

In der Literatur sind zahlreiche Messserien zur TPMT-Aktivität zu finden. Diese basieren zum Grossteil auf der HPLC-Methode mit 6-MTG als Substrat. Des Weiteren beziehen sich die meisten Literaturergebnisse der TPMT-Aktivität auf 1 ml „packed red blood cells“ (pRBC). Kröplin konnte nach Vergleich und Kalkulation von klinischen Labordaten bestätigen, dass 1 gHb 3ml pRBC entspricht. In Tabelle 7.1. sind die in der Literatur zu findenden Messserien aufgeführt. Kröplin fand bei einer Vergleichsmessung der verschiedenen Substrate (6-MP und 6-TG) heraus, dass die Aktivität bei den mit 6-MP durchgeführten Messungen 34% niedriger liegen als bei der Messung mit 6-TG (Kroplin et al., 2000). Eine Erklärung konnte Kröplin nicht liefern, bestätigte aber damit die Daten von Weinshilboum (Weinshilboum et al., 1978). Denkbar ist eine höhere Affinität von TPMT zu 6-TG als zu 6-MP. Hierzu gibt es keine wissenschaftlichen Untersuchungen. Bei Berücksichtigung eines solchen Faktors ergeben sich die in Tab 7.2. zusammengestellten TPMT-Aktivitäten. Der Mittelwert aller Studien berechnet sich dann auf 67,0 nmol/gHb*h. Dieser Wert liegt dann deutlich oberhalb des in dieser Arbeit ermittelten Mittelwerts von 45,9 nmol/gHb*h. Dafür sind neben der Umrechnung folgende drei Erklärungen denkbar:

1. Verschiedene Methylierungsraten bei verschiedenen 6-TG-Produkten verschiedener Hersteller.
2. Die Werte weisen eine hohe Schwankungsbreite auf und sind daher statistisch nicht unterschiedlich
3. Die Werte sind tatsächlich größer als der Durchschnitt in meinem Probandenkollektiv (Alter, Population).

Ad 1: Dies untersuchte Kröplin für verschiedene 6-TG- und 6-MP-Produkte. Er kam zum Ergebnis, dass in vielen 6-TG-Produkten Zusatzstoffe enthalten sind, welche die Methylierung hemmen. Für 6-MP-Produkte konnte er dies nicht nachweisen (Kroplin et al., 1999).

Ad 2: Betrachtet man in Tabelle 7.1 die Werte der TPMT-Aktivität so liegt der Wert von 45,9 nmol/gHb*h im Bereich der anderen Mittelwerte. Dies gilt ebenso für Tabelle 7.2. In Abb. 7.2. ist dies in einer Boxplot Darstellung gezeigt.

Arbeitsgruppe	Methode	Population	N	Mittelwert bei pRBC [nmol/ml pRBC*h]	Mittelwert [nmol/gHb*h]
Alves (Alves et al., 2001)	HPLC – 6MP	Portugiesen	143	23,69	<u>71,07</u>
Cara (Cara et al., 2004)	HPLC – 6MP	Spanier	11337	21,83	<u>65,49</u>
Dervieux (Dervieux et al., 1999)	HPLC – 6MP	Patienten nach Nierentransplantation	22	20,8	<u>62,4</u>
Garniere-Monteil (Garniere-Monteil et al., 1999)	HPLC – 6MP	Franzosen	70	18,2	<u>54,6</u>
Tinel (Tinel et al., 1991)	HPLC – 6MP	Franzosen	303	15,4	<u>46,2</u>
Jacqz-Aigrain (Jacqz-Aigrain et al., 1994)	HPLC – 6MP	Franzosen	300	19,3	<u>57,9</u>
Klemetsdal (Klemetsdal et al., 1992)	HPLC – 6MP	Norwegische Kaukasier	50	13,1	<u>39,3</u>
Klemetsdal (Klemetsdal et al., 1992)	HPLC – 6MP	Norwegische Saami	36	17	<u>51</u>
Weilhilsbom (Weinshilbom et al., 1980)	HPLC – 6MP	Nordamer. Kaukasier	298	12,8	<u>38,4</u>
Jones (Jones et al., 1993)	HPLC – 6MP	Nordamer. Schwarze	115	8,64	<u>25,92</u>
Lennard (Lennard et al., 1994)	HPLC – 6MP	Englische Kinder	111	13,07	<u>39,21</u>
Lennard (Lennard et al., 1994)	Radio – 6MP	Englische Kinder	111	13,24	<u>39,72</u>
Park-Hah (Park-Hah et al., 1996)	HPLC – 6MP	Koreanische Kinder	309	12,4	<u>37,2</u>
Zhang (Zhang et al., 2004)	HPLC – 6MP	Chinesische Kinder	213	13,32	<u>39,62</u>
Kröplin (Kroplin et al., 1998)	HPLC – 6TG	Deutsche	214		38,8
Kröplin (Kroplin et al., 2000)	HPLC – 6TG	Deutsche	199		54,4
Kröplin (Kroplin et al., 2000)	HPLC – 6MP	Deutsche	199		35,8
Eigene	HPLC – 6TG	Europäische Kaukasier	346		45,9

Tab. 7.1. Darstellung der in der Literatur beschriebenen TPMT-Aktivitäts-Messserien (**Arbeitsgruppe:** Autor mit Literaturangabe, **Methode:** vorne: Verfahren (HPLC, Radio: radiochemisches Verfahren), hinten: verwendetes Substrat, **Population, N:** Anzahl der Populationsprobanden, **Mittelwert bei pRBC, Mittelwert:** unterstrichene Werte: berechnete Werte unter der Annahme 1 gHb entspricht 1ml pRBC)

Arbeitsgruppe	Population	N	Mittelwert [nmol/gHb*h]
Alves (2001)	Portugiesen	143	<u>107,7</u>
Cara (2004)	Spanier	11337	<u>99,2</u>
Dervieux (1999)	Patienten nach Nierentransplantation	22	<u>94,5</u>
Garniere-Monteil (1999)	Franzosen	70	<u>82,7</u>
Tinel (1991)	Franzosen	303	<u>70,0</u>
Jacqz-Aigrain (1994)	Franzosen	300	<u>87,7</u>
Klemetsdal (1992)	Norwegische Kaukasier	50	<u>59,5</u>
Klemetsdal (1992)	Norwegische Saami	36	<u>77,3</u>
Weilhilsboun (1980)	Nordamer. Kaukasier	298	<u>58,2</u>
Jones (1993)	Nordamer. Schwarze	115	<u>39,3</u>
Lennard (1994)	Englische Kinder	111	<u>59,4</u>
Lennard (1994)	Englische Kinder	111	<u>60,2</u>
Park-Hah (1996)	Koreanische Kinder	309	<u>56,4</u>
Zhang (2004)	Chinesische Kinder	213	<u>60,5</u>
Kröplin (1998)	Deutsche	214	38,8
Kröplin (2000)	Deutsche	199	54,4
Kröplin (2000)	Deutsche	199	<u>54,2</u>
Eigene	Europäische Kaukasier	346	45,9

Tab. 7.2. Darstellung der Literatur-Messserien nach Umrechnung auf entsprechende Werte bei Bezug auf 6-TG als Substrat (**Arbeitsgruppe:** Autor mit Literaturangabe, **Population, N:** Anzahl der Populationsprobanden, **Mittelwert:** unterstrichene Werte: berechnete Werte)

Ad 3: Hinsichtlich eines geschlechtsspezifischen Unterschieds der TPMT-Aktivität lässt sich in der Literatur keine Serie finden, die einen signifikanten Unterschied belegt. Klemetsdal fand in seiner Saami-Population 1992 einen geschlechtsspezifischen Unterschied mit höheren Aktivitäten bei Männern gegenüber Frauen (Klemetsdal et al., 1992) und einen geschlechtsspezifischen Unterschied bei Kindern mit ebenfalls leicht höheren Werten bei Jungen gegenüber Mädchen (Klemetsdal et al., 1995). Ebenso konnte Zhang auch nur einen nicht signifikanten Unterschied bei chinesischen Kindern feststellen mit leicht höheren Werten bei Mädchen gegenüber der Jungen (Zhang et al., 2004). Zahlreiche andere Autoren haben ebenso keinen geschlechtsspezifischen Unterschied herausfinden können (Jacqz-Aigrain et al., 1994; Jones et al., 1993; Lee et al., 1993; Lennard et al., 1987; Lennard et al., 1990; Lennard et al., 1994; Park-Hah et al., 1996; Tinel et al., 1991; Weinshilboun et al., 1980).

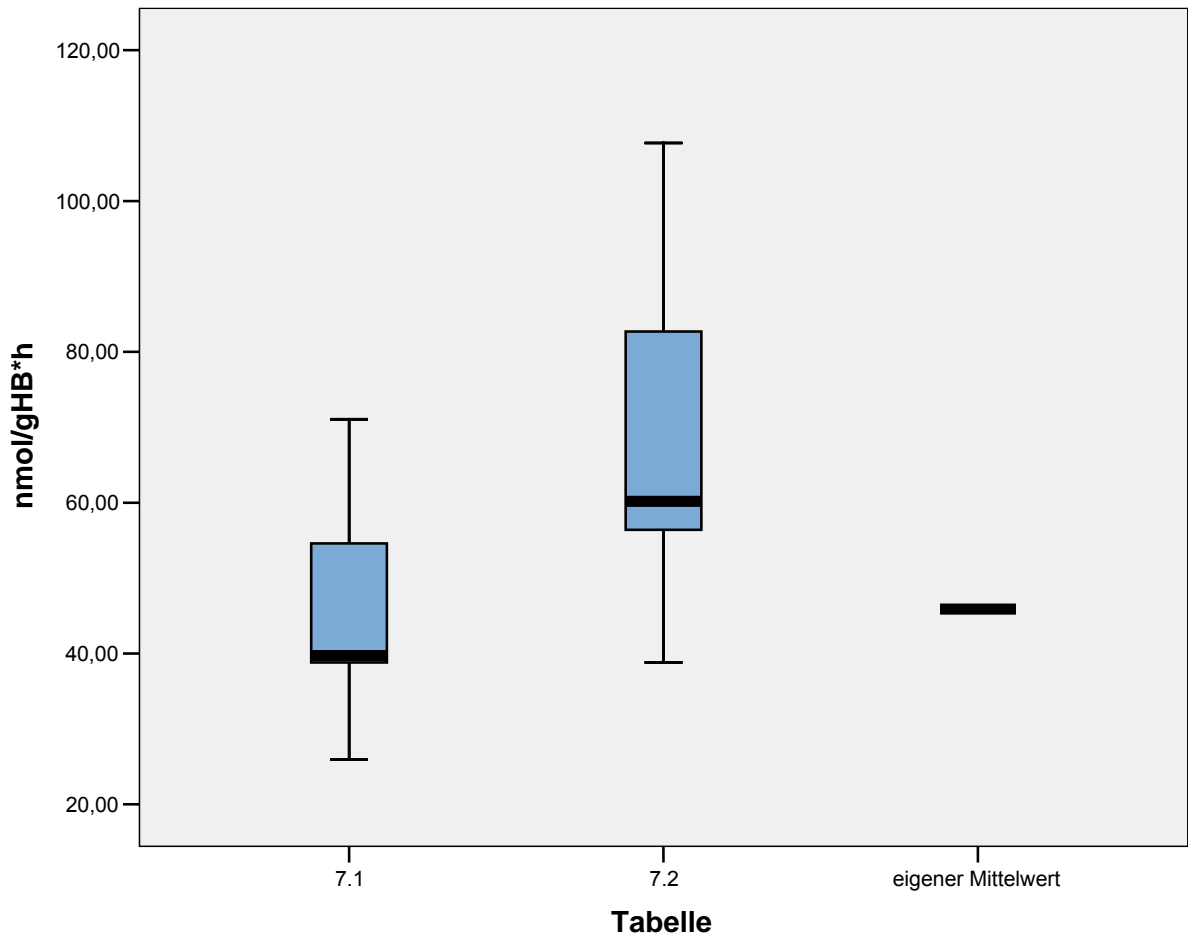


Abb. 7.2. Boxplotdarstellung der Mittelwerte aus Tabelle 7.1. und 7.2 im Vergleich zum in dieser Arbeit ermittelten Mittelwert.

Die hier gefundene signifikant höhere Aktivität im ersten Lebensjahr ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Park-Hah hat lediglich eine nicht signifikante Aktivitätsabnahme im Altersabschnitt von 7 bis 9 Jahren sehen können (Park-Hah et al., 1996). Klemetsdal spricht von einer negativen Korrelation von Alter und Aktivität (Klemetsdal et al., 1995). Denkbar ist jedoch eher, dass durch den höheren Anteil an Retikulozyten im ersten Lebensjahr dieser signifikante Unterschied erklärt werden kann.

Die Unterschiede der in der Literatur beschriebenen Referenzwerte bestätigt, dass mit der Etablierung einer Methode auch Referenzwerte erstellt werden müssen. Der nicht vorhandene geschlechtsspezifische Unterschied der TPMT-Aktivität kann die höhere Rezidivwahrscheinlichkeit bei akuter lymphatischer Leukämie von Jungen gegenüber Mädchen (Carroll et al., 2003) nicht erklären. Ob eine höhere Aktivität in Retikulozyten als in reifen Erythrozyten besteht, ist eine begründete Vermutung, die in der Zukunft noch untersucht werden muss.

7.3. Aktivität in anderen Blutzellen

7.3.1. Aktivität in Knochenmarkszellen

Bei beiden hier untersuchten Patienten konnte eine TPMT-Aktivität in Knochenmarkszellen nachgewiesen werden. Aufgrund des anderen Bezuges auf den Hämoglobingehalt in den RBC-Lysaten nach Verarbeitung des Vollblutes und nicht wie bei den KM-Zellen auf die Zellzahl ist ein direkter Vergleich zur Aktivität in Erythrozyten nicht möglich. Die gemessene Aktivität war mit 5,668 nmol/10⁹ KM-Zellen*h und 6,248 nmol/10⁹ KM-Zellen*h im gleichen Grössenbereich.

In der Literatur findet man nur von McLeod einen Vergleichswert (McLeod et al., 1995). Er beschreibt eine mediane Aktivität von 17,6 nmol/10⁹ KM-Zellen*h mit einem Wertebereich von 3,3 bis 88,9 nmol/10⁹ KM-Zellen*h bei n=42 Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie. Die von ihm benutzte Methode basierte auf der Methylation von 6-MP als Substrat. Die bei Erythrozyten beobachtete TPMT-Aktivitätsabhängigkeit vom Substrat 6-MP oder 6-TG (Kroplin et al., 2000) mit 34% niedrigerer Aktivität mit 6-MP gegenüber 6-TG ist für KM-Zellen nicht untersucht worden, aber anzunehmen, so dass die Ergebnisse von McLeod sich nach Umrechnung wie folgt darstellen:

17,6 nmol/10⁹ KM-Zellen*h mit 6-MP (Wertebereich: 3,3 bis 88,9 nmol/10⁹ KM-Zellen*h)
entspricht dann

26,7 nmol/10⁹ KM-Zellen*h mit 6-TG (Wertebereich: 5 bis 134,7 nmol/10⁹ KM-Zellen*h).

Die hier gemessenen Werte liegen somit im entsprechenden Intervall. Es kann somit festgehalten werden, dass die Messung der TPMT-Aktivität aus Knochenmarkszellen mit der hier beschriebenen Methode möglich ist.

7.3.2. Aktivität in Leukämiezellen

Auch hier ließen sich bei allen drei Patienten TPMT-Aktivitäten aus isolierten Leukämiezellen messen. Ebenso wie bei den Knochenmarkszellen ist auch bei den Leukämiezellen ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit den bestimmten Referenzwerten

nicht möglich. Interessant ist aber die Unterschiedlichkeit der bestimmten Aktivitäten aus den Leukämiezellen (LM) mit 6,286 nmol/10⁹ LM-Zellen*h, 9,943 nmol/10⁹ LM-Zellen*h und 32,887 nmol/10⁹ LM-Zellen*h.

Unter der Voraussetzung, dass McLeod Knochenmarkszellen zum Zeitpunkt der Diagnose einer Leukämie untersuchte, können seine Werte unmittelbar mit den hier bestimmten Werten verglichen werden (McLeod et al., 1995). Nach Umrechnung liegen die Werte von McLeod zwischen 5 und 134,7 nmol/10⁹ KM-Zellen*h. Unter dieser Annahme stimmen die hier bestimmten Werte ebenfalls von der Größenordnung überein mit den von McLeod beobachteten Werten. Somit ist die Bestimmung der TPMT-Aktivität mit 6-TG als Substrat aus Leukämiezellen möglich.

7.3.3. Vergleich der Aktivität in Leukämiezellen und Knochenmarkszellen

Der Vergleich der gemessenen Werte zeigt die Gleichheit der TPMT-Aktivität in Knochenmarks- und Leukämiezellen beim selben Patienten. Aus der Literatur gibt es hierzu keine vergleichbaren Untersuchungen.

8. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

8.1. Verzeichnis der Tabellen

	Seite
Tab. 5.1.: Einstellungen des HPLC-Systems bei Messung der Aktivität der Thiopurin-S-Methyltransferase	25
Tab. 5.2.: Ergebnisdarstellung zur qualitativen Analyse	28
Tab. 6.1. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben	33
Tab. 6.2. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben zur Äquivalenzprüfung	34
Tab. 6.3. Vergleich der Aktivität bei verschiedener Lagerungszeit des Vollblutes über 2 Tage	35
Tab. 6.4. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben	35
Tab. 6.5. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben zur Äquivalenzprüfung	35
Tab. 6.6. Vergleich der Aktivität bei verschiedener Lagerungszeit des Vollblutes über 14 Tage	36
Tab. 6.7. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben	36

Tab. 6.8. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben zur Äquivalenzprüfung	37
Tab. 6.9. Vergleich der Aktivität bei verschiedenen Lagerungstemperaturen (-30°C und -80°C)	37
Tab. 6.10. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben	38
Tab. 6.11. statistische Auswertung der Wiederfindungsrate durch Korrelationen bei gepaarten Stichproben zur Äquivalenzprüfung	38
Tab. 6.12. Darstellung der Mittelwert der Aktivität für die verschiedenen Patientenkollektive	43
Tab. 6.13. statistische Auswertung des Mittelwertunterschiedes der Aktivität von Probanden im ersten Lebensjahr zum Rest des Kollektivs durch Korrelationen bei ungepaarten Stichproben	44
Tab. 6.14. Ergebnisse der TPMT-Aktivitätsmessung aus Knochenmarkszellen (KM-Zellen)	44
Tab. 6.15. Ergebnisse der TPMT-Aktivitätsmessung aus Leukämiezellen (LM-Zellen)	45
Tab. 6.16. Vergleich der Aktivität in Leukämiezellen (LM-Zellen) und Knochenmarkszellen (KM-Zellen)	45
Tab. 7.1. Darstellung der in der Literatur beschriebenen TPMT-Aktivitäts-Messserien	51
Tab. 7.2. Darstellung der Literatur-Messserien nach Umrechnung auf entsprechende Werte bei Bezug auf 6-TG als Substrat	52

8.2. Verzeichnis der Abbildungen

	Seite
Abb. 4.1.: Altersverteilung der Probanden aus 4.2.	17
Abb. 4.2. geschlechtsspezifische Altersverteilung der Probanden aus 4.2.	17
Abb. 5.1.: Schematischer Aufbau einer HPLC-Anlage zur isokratischen Arbeitsweise	23
Abb. 5.2.: Foto der benutzten HPLC-Anlage	24
Abb. 5.3.: Schematische Darstellung eines Chromatogramms	26
Abb. 5.4.: Kalibrationskurve zur Bestimmung des Responde-Faktors	27
Abb. 5.5.: Chromatogramm eines zur Bestimmung der Retentionszeit t_R verwendeten Standards	29
Abb. 5.6.: Chromatogramm eines Kontrollstandards aus dem Lauf von Abb. 5.5.	30
Abb. 6.1. Darstellung der TPMT-Aktivität als Mittelwert in Abhängigkeit zur Zeit	32
Abb. 6.2. Altersabhängigkeit der Aktivität	39
Abb. 6.3. Altersabhängigkeit der Aktivität von männlichen Probanden	40
Abb. 6.4. Altersabhängigkeit der Aktivität von weiblichen Probanden	41
Abb. 6.5. Altersabhängigkeit der Aktivität von deutschen Probanden	42
Abb. 7.1. Schematische Darstellung des Stoffwechsel von Azathioprin, 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin	47

Abb. 7.2. Boxplotdarstellung der Mittelwerte aus Tabelle 7.1. und 7.2 im Vergleich zum in dieser Arbeit ermittelten Mittelwert 53

9. Literaturverzeichnis

1. Adamson, P.C., Poplack, D.G., Balis, F.M. (1990) Pharmacology and drug resistance in childhood lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 4: 871-94
2. Alves, S., Amorim, A., Ferreira, F., Prata, M.J. (2001) Influence of the variable number of tandem repeats located in the promoter region of the thiopurine methyltransferase gene on enzymatic activity. *Clin Pharmacol Ther* 70: 165-74
3. Balis, F.M., Adamson, P.C. (1999) Application of pharmacogenetics to optimization of mercaptopurine dosing. *J Natl Cancer Inst* 91: 1983-5
4. Belaiche, J., Desager, J.P., Horsmans, Y., Louis, E. (2001) Therapeutic drug monitoring of azathioprine and 6-mercaptopurine metabolites in Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* 36: 71-6
5. Berg, S.L., Steuber, P., Poplack, D.G. (2000) Clinical manifestations of acute lymphoblastic leukemia. In: *Hematology, Basic Principles and Practise* (eds Hoffmann, R., Benz, Jr E.J., Shattil, S.J., Furie, B., Cohen, H.J., Silberstein, L.E. & McGlave, P.) pp. 1070-1078. Churchill Livingstone, New York
6. Breitsprecher, R. (1998) *Pons Wörterbuch für Schule und Studium - Collins: Teil 1 Englisch - Deutsch*. Klett, Stuttgart, Düsseldorf, Leipzig
7. Burchenal, J.H., Murphy, M.L., Ellison, R.R., Sykes, M.P., Tan, T.C., Leone, L.A., Karnofsky, D.A., Craver, L.F., Dargeon, H.W., Rhoads, C.P. (1953) Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood* 8: 965-99

8. Cara, C.J., Pena, A.S., Sans, M., Rodrigo, L., Guerrero-Esteo, M., Hinojosa, J., Garcia-Paredes, J., Guijarro, L.G. (2004) Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice. *Med Sci Monit* 10: RA247-54
9. Carroll, W.L., Bhojwani, D., Min, D.J., Raetz, E., Relling, M., Davies, S., Downing, J.R., Willman, C.L., Reed, J.C. (2003) Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 102-31
10. Chan, K.W. (2002) Acute lymphoblastic leukemia. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 32: 40-9
11. Dervieux, T., Medard, Y., Baudouin, V., Maisin, A., Zhang, D., Broly, F., Loirat, C., Jacqz-Aigrain, E. (1999) Thiopurine methyltransferase activity and its relationship to the occurrence of rejection episodes in paediatric renal transplant recipients treated with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 48: 793-800
12. Elion, G.B. (1989) The purine path to chemotherapy. *Science* 244: 41-7
13. Evans, W.E., Petros, W.P., Relling, M.V., Crom, W.R., Madden, T., Rodman, J.H., Sunderland, M. (1989) Clinical pharmacology of cancer chemotherapy in children. *Pediatr Clin North Am* 36: 1199-230
14. Evans, W.E., Horner, M., Chu, Y.Q., Kalwinsky, D., Roberts, W.M. (1991) Altered mercaptopurine metabolism, toxic effects, and dosage requirement in a thiopurine methyltransferase-deficient child with acute lymphocytic leukemia. *J Pediatr* 119: 985-9
15. Evans, W.E., Hon, Y.Y., Bomgaars, L., Coutre, S., Holdsworth, M., Janco, R., Kalwinsky, D., Keller, F., Khatib, Z., Margolin, J., Murray, J., Quinn, J., Ravindranath, Y., Ritchey, K., Roberts, W., Rogers, Z.R., Schiff, D., Steuber, C., Tucci, F., Kornegay, N., Krynetski, E.Y., Relling, M.V. (2001) Preponderance of thiopurine S-methyltransferase deficiency and heterozygosity among patients intolerant to mercaptopurine or azathioprine. *J Clin Oncol* 19: 2293-301

16. Evans, W.E. (2004) Pharmacogenetics of thiopurine S-methyltransferase and thiopurine therapy. *Ther Drug Monit* 26: 186-91
17. Ganiere-Monteil, C., Pineau, A., Kergueris, M.F., Azoulay, C., Bourin, M. (1999) Thiopurine methyl transferase activity: new extraction conditions for high-performance liquid chromatographic assay. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 727: 235-9
18. Hongeng, S., Sasanakul, W., Chuansumrit, A., Pakakasama, S., Chattananon, A., Hathirat, P. (2000) Frequency of thiopurine S-methyltransferase genetic variation in Thai children with acute leukemia. *Med Pediatr Oncol* 35: 410-4
19. Jacqz-Aigrain, E., Bessa, E., Medard, Y., Mircheva, Y., Vilmer, E. (1994) Thiopurine methyltransferase activity in a French population: h.p.l.c. assay conditions and effects of drugs and inhibitors. *Br J Clin Pharmacol* 38: 1-8
20. Jones, C.D., Smart, C., Titus, A., Blyden, G., Dorvil, M., Nwadike, N. (1993) Thiopurine methyltransferase activity in a sample population of black subjects in Florida. *Clin Pharmacol Ther* 53: 348-53
21. Katsch, P., Spix, C. (2004) Jahresbericht 2004 (1980-2003) des Deutschen Kinderkrebsregisters. Mainz
22. Klemetsdal, B., Tollefsen, E., Loennechen, T., Johnsen, K., Utsi, E., Gisholt, K., Wist, E., Aarbakke, J. (1992) Interethnic difference in thiopurine methyltransferase activity. *Clin Pharmacol Ther* 51: 24-31
23. Klemetsdal, B., Flaegstad, T., Aarbakke, J. (1995) Is there a gender difference in red blood cell thiopurine methyltransferase activity in healthy children? *Med Pediatr Oncol* 25: 445-9
24. Kroplin, T., Weyer, N., Gutsche, S., Iven, H. (1998) Thiopurine S-methyltransferase activity in human erythrocytes: a new HPLC method using 6-thioguanine as substrate. *Eur J Clin Pharmacol* 54: 265-71

25. Kroplin, T., Fischer, C., Iven, H. (1999) Inhibition of thiopurine S-methyltransferase activity by impurities in commercially available substrates: a factor for differing results of TPMT measurements. *Eur J Clin Pharmacol* 55: 285-91
26. Kroplin, T., Iven, H. (2000) Methylation of 6-mercaptopurine and 6-thioguanine by thiopurine S-methyltransferase. A comparison of activity in red blood cell samples of 199 blood donors. *Eur J Clin Pharmacol* 56: 343-5
27. Lee, E.J., Kalow, W. (1993) Thiopurine S-methyltransferase activity in a Chinese population. *Clin Pharmacol Ther* 54: 28-33
28. Lee, W., Lockhart, A.C., Kim, R.B., Rothenberg, M.L. (2005) Cancer pharmacogenomics: powerful tools in cancer chemotherapy and drug development. *Oncologist* 10: 104-11
29. Lennard, L., Van Loon, J.A., Lilleyman, J.S., Weinshilboum, R.M. (1987) Thiopurine pharmacogenetics in leukemia: correlation of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity and 6-thioguanine nucleotide concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 41: 18-25
30. Lennard, L., Van Loon, J.A., Weinshilboum, R.M. (1989) Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 46: 149-54
31. Lennard, L., Lilleyman, J.S., Van Loon, J., Weinshilboum, R.M. (1990) Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 336: 225-9
32. Lennard, L., Singleton, H.J. (1994) High-performance liquid chromatographic assay of human red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *J Chromatogr B Biomed Appl* 661: 25-33
33. Lennard, L., Chew, T.S., Lilleyman, J.S. (2001) Human thiopurine methyltransferase activity varies with red blood cell age. *Br J Clin Pharmacol* 52: 539-46

34. Lightfoot, T.J., Roman, E. (2004) Causes of childhood leukaemia and lymphoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 199: 104-17
35. McLeod, H.L., Lin, J.S., Scott, E.P., Pui, C.H., Evans, W.E. (1994) Thiopurine methyltransferase activity in American white subjects and black subjects. *Clin Pharmacol Ther* 55: 15-20
36. McLeod, H.L., Krynetski, E.Y., Wilimas, J.A., Evans, W.E. (1995) Higher activity of polymorphic thiopurine S-methyltransferase in erythrocytes from neonates compared to adults. *Pharmacogenetics* 5: 281-6
37. McLeod, H.L., Relling, M.V., Liu, Q., Pui, C.H., Evans, W.E. (1995) Polymorphic thiopurine methyltransferase in erythrocytes is indicative of activity in leukemic blasts from children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 85: 1897-902
38. Mehta, P.A., Davies, S.M. (2004) Pharmacogenetics of acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol* 11: 434-8
39. Miller, R.W., Young, J.L., Jr., Novakovic, B. (1995) Childhood cancer. *Cancer* 75: 395-405
40. Nygaard, U., Schmiegelow, K. (2003) Dose reduction of coadministered 6-mercaptopurine decreases myelotoxicity following high-dose methotrexate in childhood leukemia. *Leukemia* 17: 1344-8
41. Park-Hah, J.O., Klemetsdal, B., Lysaa, R., Choi, K.H., Aarbakke, J. (1996) Thiopurine methyltransferase activity in a Korean population sample of children. *Clin Pharmacol Ther* 60: 68-74
42. Parkin, D.M., Stiller, C.A., Draper, G.J., Bieber, C.A. (1988) The international incidence of childhood cancer. *Int J Cancer* 42: 511-20

43. Parkin, D.M., Kramárová, E., Draper, G.J., Masuyer, E., Michaelis, J., Neglia, J., Qureshi, S., Stiller, C.A. (1998) International Incidence of Childhood Cancer, Vol. II. IARC Sci Publ 1-391
44. Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J. (1999) Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 49: 33-64, 1
45. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005) Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin 55: 74-108
46. Pui, C.H. (1997) Acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Clin North Am 44: 831-46
47. Pui, C.H., Evans, W.E. (1998) Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 339: 605-15
48. Pui, C.H. (2004) Recent advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Formos Med Assoc 103: 85-95
49. Pui, C.H., Schrappe, M., Ribeiro, R.C., Niemeyer, C.M. (2004) Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program) 118-45
50. Redaelli, A., Laskin, B.L., Stephens, J.M., Botteman, M.F., Pashos, C.L. (2005) A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). Eur J Cancer Care (Engl) 14: 53-62
51. Relling, M.V., Hancock, M.L., Boyett, J.M., Pui, C.H., Evans, W.E. (1999) Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. Blood 93: 2817-23
52. Relling, M.V., Hancock, M.L., Rivera, G.K., Sandlund, J.T., Ribeiro, R.C., Krynetski, E.Y., Pui, C.H., Evans, W.E. (1999) Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. J Natl Cancer Inst 91: 2001-8

53. Schaeffeler, E., Lang, T., Zanger, U.M., Eichelbaum, M., Schwab, M. (2001) High-throughput genotyping of thiopurine S-methyltransferase by denaturing HPLC. *Clin Chem* 47: 548-55
54. Schrappe, M., Beier, R., Burger, B. (2002) New treatment strategies in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 15: 729-40
55. Schutz, E., Gummert, J., Armstrong, V.W., Mohr, F.W., Oellerich, M. (1996) Azathioprine pharmacogenetics: the relationship between 6-thioguanine nucleotides and thiopurine methyltransferase in patients after heart and kidney transplantation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 34: 199-205
56. Schwedt, G. (1996) Taschenatlas der Analytik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart,
57. Stiller, C.A. (2004) Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene* 23: 6429-44
58. Tan, B.B., Lear, J.T., Gawkrödger, D.J., English, J.S. (1997) Azathioprine in dermatology: a survey of current practice in the U.K. *Br J Dermatol* 136: 351-5
59. Tidd, D.M., Paterson, A.R. (1974) A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. *Cancer Res* 34: 738-46
60. Timischl, W. (2000) Biostatistik. Springer, Wien - New York
61. Tinel, M., Berson, A., Pessayre, D., Letteron, P., Cattoni, M.P., Horsmans, Y., Larrey, D. (1991) Pharmacogenetics of human erythrocyte thiopurine methyltransferase activity in a French population. *Br J Clin Pharmacol* 32: 729-34
62. Weinshilboum, R.M., Raymond, F.A., Pazmino, P.A. (1978) Human erythrocyte thiopurine methyltransferase: radiochemical microassay and biochemical properties. *Clin Chim Acta* 85: 323-33

63. Weinshilboum, R.M., Sladek, S.L. (1980) Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 32: 651-62
64. Zhang, J.P., Guan, Y.Y., Wu, J.H., Xu, A.L., Zhou, S., Huang, M. (2004) Phenotyping and genotyping study of thiopurine S-methyltransferase in healthy Chinese children: a comparison of Han and Yao ethnic groups. *Br J Clin Pharmacol* 58: 163-8

10. Dank

Herrn Prof. Dr. med. Graf möchte ich für Themenstellung, die gute Betreuung und insbesondere für die Leitung der Arbeit sowie die fruchtbaren Diskussionen danken.

Frau Frisch als Vertreterin des onkologischen Forschungslabors der Universitätskinderklinik danke ich für das Engagement und die Mithilfe in der Umsetzung bei allen Experimenten.

Dem Forschungslabor der Universitäts-Kinderklinik Homburg / Saar sowie dem Zentrallabor des Universitätsklinikum des Saarlandes Homburg / Saar seien für die freundliche Benutzung einzelner Geräte gedankt.

Ich danke dem Blutzelllabor der Klinik für Innere Medizin I - Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie der Universitätskliniken des Saarlandes für die Zusammenarbeit.

Dem Personal und den Ärzten der beteiligten Stationen der Universitäts-Kinderklinik Homburg / Saar danke ich für die kooperative Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel im Rahmen der Labor- und Gerätenutzung bedanke ich mich bei der Elterninitiative krebskranker Kinder e.V. Saarland.

Zu guter letzt bedanke ich mich bei allen Probanden und deren Eltern, ohne die diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

11. Lebenslauf

Steffen Heinzmann

Persönliche Angaben

- geboren am: 09. Dezember 1974 als Sohn des Universitätsprofessors Dr. Ulrich Heinzmann und der Apothekerin Hannelore Heinzmann
- Geburtsort: Münster / Westfalen
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Konfession: römisch-katholisch

Ausbildung

- | | |
|-------------|---|
| 1981 – 1985 | Mühlenau-Grundschule in Berlin / Zehlendorf |
| 1985 – 1994 | Ratsgymnasium Bielefeld mit Abschluss Abitur, großes Latinum |
| 1994 – 1995 | Zivildienst bei den Städt. Krankenanstalten Bielefeld Mitte auf der anästhesiologischen Intensivstation |
| 1995 | Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes |
| 1997 | Ablegen der Ärztliche Vorprüfung |
| 1997 – 1998 | Auslandsstudium an der Université Louis-Pasteur in Strasbourg (Frankreich) |
| 1999 | Ablegen des 1. Staatsexamen |
| 2001 | Ablegen des 2. Staatsexamen |
| 2002 | Ablegen des 3. Staatsexamen, Abschluss des Studiums |
| 2002 – 2003 | Arzt im Praktikum (siehe unten) |
| Dez. 2003 | Übernahme ins Assistenzarztverhältnis in der Klinik f. Unfall-, Hand- u. Wiederherstellungs-chirurgie der Univ.-Kliniken des Saarlandes |
| Okt. 2004 | Beginn der Rotation in der Orthopädischen Universitätsklinik des Saarlandes unter der Leitung von Prof. Dr. D. Kohn |

Famulaturen

- 1998 Radiologie an der Universität Strasbourg
- 1998 Anästhesie an den Städt. Kliniken Bielefeld Mitte
- 1999 Innere Medizin in einer Praxis in Bielefeld
- 2000 Unfallchirurgie in der Univ.-Klinik Wien
- 2001 Pädiatrie in der Univ.-Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Homburg

Praktisches Jahr

- 1. Tertial Chirurgie an der Univ.-Klinik des Saarlandes für
- Allgemeinchirurgie, Abdominal- und
Gefäßchirurgie unter Prof. Dr. Schilling
- Unfallchirurgie unter Prof. Dr. Pohlemann
- 2. Tertial Innere Medizin in der internistischen Notaufnahme
der Universitätskliniken des Saarlandes
- 3. Tertial Radiologie am Spital Grabs (Schweiz)

Arzt im Praktikum

01.06.2002 – 30.11.2003: AiP an den Universitätskliniken des Saarlandes, Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. Pohlemann, Direktor der Klinik

Homburg, den 11.11.2005

12. Anhang: Abkürzungen

6-MP	-	6-Mercaptopurin
6-MTG	-	6-Methylthioguanin
6-TG	-	6-Thioguanin
6-TGN	-	6-Thioguaninnukleotid
ALL	-	akute lymphatische Leukämie
Aqua dest.	-	Aqua destillata
DNS	-	Desoxyribonukleinsäure
EDV	-	elektronische Datenverarbeitung
Hb	-	Hämoglobin
HBSS	-	Hanks' balanced Salt solution
HPLC	-	High performance liquid chromatography
IQR	-	Interquartilsabstand
KM-Zellen	-	Knochenmark-Zellen
LM-Zellen	-	Leukämie-Zellen
min	-	Minute
MTX	-	Methotrexat
PBS	-	Phosphat buffered saline
RBC-Lysat	-	Red Blood Cell - Lysat
RNS	-	Ribonukleinsäure
SAM	-	S-Adenosyl-L-Methionin
sec.	-	Sekunde
TPMT	-	Thiopurin-S-Methyltransferase
ZNS	-	Zentrales Nervensystem